

STÉFANI ROSSI

**USO DE BIOMARCADORES PARA A DETECÇÃO DE EFEITOS SUBLETAIS DOS
PESTICIDAS ROUNDUP® E HEXARON® EM *Astyanax* sp. (*Pisces, Teleostei*)**

**CURITIBA
2008**

STÉFANI ROSSI

**USO DE BIOMARCADORES PARA A DETECÇÃO DE EFEITOS SUBLETAIS DOS
PESTICIDAS ROUNDUP® E HEXARON® EM *Astyanax* sp. (*Pisces, Teleostei*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis.

**CURITIBA
2008**

DEDICATÓRIA e AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, que mesmo distante “é parte ainda do que me faz forte”,

À minha mãe e aos meus irmãos pelo apoio e incentivo,

À professora Helena Cristina da Silva Assis pela orientação,

Ao CNPq pelo apoio financeiro,

E à todos os meus amigos que de alguma forma participaram e tornaram essa

jornada fantástica!!

EPÍGRAFE

“O homem é parte da natureza e sua guerra contra ela é inevitavelmente uma guerra contra si mesmo... Temos pela frente um desafio como nunca a humanidade teve, de provar nossa maturidade e domínio, não da natureza, mas de nós mesmos”.

Rachel Carson

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	iv
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 PESTICIDAS E CANA-DE-AÇUCAR	13
2.2 HEXARON WG [®]	14
2.3 ROUNDUP [®]	16
2.4 CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR PESTICIDAS	18
2.5 BIOMARCADORES	20
2.5.1 Biomarcadores bioquímicos	20
2.5.2 Micronúcleo písceo	24
2.5.3 Histopatologia de Brânquias	25
2.6 MODELO BIOLÓGICO	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 ANIMAIS	29
4.2 PRÉ – EXPERIMENTO I – ROUNDUP [®]	29
4.3 PRÉ – EXPERIMENTO II – HEXARON WG [®]	30
4.4 EXPERIMENTO ROUNDUP [®] , HEXARON [®] E MISTURA	30
4.4.1 Processamento do material	31
4.4.2 Extração Enzimática	31
4.4.3 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	32
4.4.4 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)	32
4.4.5 Atividade da Catalase (CAT)	33
4.4.6 Lipoperoxidação (LPO)	33
4.4.7 Concentração protéica	34

4.4.8 Micronúcleo Písceo	34
4.4.9 Histopatologia de Brânquias	34
4.4.10 Análise Estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 PRÉ – EXPERIMENTO I – ROUNDUP®	36
5.2 PRÉ – EXPERIMENTO II – HEXARON WG®	36
5.3 EXPERIMENTOS ROUNDUP®, HEXARON WG® E MISTURA	36
5.3.1 Atividade da GST	36
5.3.2 Atividade da CAT	38
5.3.3 Lipoperoxidação (LPO)	39
5.3.4 Atividade da AChE	41
5.3.5 Micronúcleo písceo	42
5.3.6 Histopatologia de Brânquias	45
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fórmula Estrutural do herbicida Diuron _____	15
FIGURA 2 - Fórmula Estrutural do herbicida Hexazinona _____	16
FIGURA 3 - Fórmula Estrutural a substância ativa do herbicida Roundup®, o Glifosato _____	18
FIGURA 4 - Movimentos dos pesticidas para ambientes aquáticos _____	19
FIGURA 5 - Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação _____	23
FIGURA 6 - Modelo Biológico - <i>Astyanax</i> sp _____	27
FIGURA 7 - Fundamento do método de Ellman <i>et al.</i> (1961) _____	32
FIGURA 8 - Atividade específica da GST em <i>Astyanax</i> sp expostos ao herbicida Roundup® e a mistura deste com o herbicida Hexaron WG® _____	37
FIGURA 9 - Atividade específica da GST em <i>Astyanax</i> sp expostos ao herbicida Hexaron WG® e a mistura deste com o herbicida Roundup® _____	37
FIGURA 10 - Atividade específica da CAT em <i>Astyanax</i> sp expostos ao herbicida Roundup® e a mistura deste com o herbicida hexaron WG® _____	38
FIGURA 11 - Atividade específica da GST em <i>Astyanax</i> sp expostos ao herbicida hexaron WG® e a mistura deste com o herbicida Roundup® _____	39
FIGURA 12 - Lipoperoxidação em <i>Astyanax</i> sp expostos ao herbicida Roundup® e a mistura deste com o herbicida Hexaron WG® _____	40
FIGURA 13 - Lipoperoxidação em <i>Astyanax</i> sp expostos ao herbicida Hexaron WG® e a mistura deste com o herbicida Roundup® _____	40
FIGURA 14 - Atividade específica da AChE em <i>Astyanax</i> sp expostos ao herbicida Roundup® e a mistura deste com o herbicida hexaron WG® _____	41
FIGURA 15 - Atividade específica da AChE em <i>Astyanax</i> sp expostos ao herbicida Hexaron WG® e a mistura deste com o herbicida Roundup® _____	42
FIGURA 16 - Alterações Nucleares e micronúcleos em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp. expostos ao herbicida Roundup® e a mistura deste com o herbicida hexaron WG® _____	43
FIGURA 17 - Alterações Nucleares e micronúcleos em eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp. expostos ao herbicida Hexaron WG® e a mistura deste com o herbicida Roundup® _____	43

FIGURA 18 - Eritrócitos de <i>Astyanax</i> sp. dos diferentes grupos. Coloração em Giemsa 10%_____	44
FIGURA 19 - Cortes histológicos do segundo arco branquial de <i>Astyanax</i> sp. dos diferentes grupos. Coloração em Hematoxilina e Eosina (HE)_____	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- AChE – Acetilcolinesterase
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATC – Iodeto de Acetilcolina
BChE – Butirilcolinesterase
BHT – Hidroxitolueno Butilato
CAT – Catalase
CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
ChE – Acetilcolina
CL₅₀ – concentração subletal 50%
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DTNB – Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERO – Espécie(s) Reativa(s) de Oxigênio
ERN – Espécie(s) Reativa(s) de Nitrogênio
FOX – do inglês *Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*
GSH – Glutathiona Reduzida
GPx – Glutathiona peroxidase
GR – Glutathiona redutase
GST – Glutathiona S-transferase
H15 – Grupo hexaron WG[®] 15mg.L⁻¹
H30 – Grupo hexaron WG[®] 30mg.L⁻¹
LPO – Peroxidação Lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)
PCB – Bifenils policlorados
PAH – Policíclicos aromáticos
RA – Grupo roundup[®] 0,006ml.L⁻¹
RB – Grupo roundup[®] 0,003ml.L⁻¹
SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
UFPR – Universidade Federal do Paraná
WHO – do inglês *World Health Organization*

RESUMO

A contaminação da água, do solo, do ar e do homem por resíduos sólidos e pesticidas talvez seja o problema mais grave da agricultura intensiva. Os pesticidas podem alcançar o ambiente aquático através de diversas formas, e uma vez disponível na água podem penetrar nos organismos aquáticos e causar toxicidade. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos subletais da exposição da espécie *Astyanax* sp a dois pesticidas da classe dos herbicidas, comumente utilizados na cultura de cana-de-açúcar: Roundup® e Hexaron WG®, através da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no músculo, das enzimas catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), e do ensaio de lipoperoxidação lipídica (LPO) no fígado, e ainda através do teste de micronúcleo pisco e histopatologia de brânquias. Para tanto foram utilizados 6 grupos: Controle H₂O (CO), Roundup® 0,006 ml.L⁻¹ (RA), Roundup® 0,003ml.L⁻¹ (RB), Hexaron WG® 30 mg⁻¹ (H30), Hexaron WG® 15 mg.L⁻¹ (H15) e Mistura Roundup® 0,003ml.L⁻¹+ Hexaron WG® 30 mg.L⁻¹ (MT). A atividade da enzima AChE, expressa em nmol.mg prot⁻¹, foi menor no grupo MT (169,2±18,98; p<0,05) quando comparada aos grupos D30 (372,9±40,36) e RB (319,8±43,41). A atividade da enzima catalase, expressa em μmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹, diminuiu no grupo D30 (531,1±53,22) em comparação ao grupo CO (845,9±76,46; p<0,05). A atividade da enzima GST, expressa em nmol.min⁻¹.mgproteína⁻¹, aumentou no grupo D30 (233,8±8,463) quando comparada ao CO (133,9±3,603; p<0,05). A lipoperoxidação, expressa em nmol.mg prot⁻¹, aumentou nos grupos MT (6,533±0,8831) e RA (4,936±0,3702) em comparação ao CO (2,456±0,1546; p<0,05). O grupo MT apresentou maior frequência de alterações nucleares que o grupo CO. A análise histopatológica das brânquias não se mostrou diferente entre os grupos. O resultado referente à atividade da enzima AChE mostra que os compostos investigados possuem neurotoxicidade quando misturados, sugerindo um possível efeito potenciador. A atividade aumentada da GST indica que esta via de metabolização está sendo ativada no grupo D30. Já os resultados referentes a LPO mostram que está ocorrendo dano de membrana nos grupos MT e RA, o que pode estar relacionado ao aumento da frequência de alterações nucleares no grupo MT. A diminuição da atividade da enzima CAT pode ser devido a sua inibição ou baixa produção, podendo estar envolvidos os mecanismos de captação de metais essenciais para a sua síntese. Quanto à análise histopatológica das brânquias, o mais provável é que o tempo de exposição nestas concentrações, não foi suficiente para acarretar lesões de forma a comprometer a estrutura e o funcionamento das mesmas. Nossos resultados mostram que mesmo em baixas concentrações dos herbicidas, foi possível se detectar alterações causadas pelos mesmos em alguns dos biomarcadores testados.

ABSTRACT

The solid residues and pesticides contamination of the water, the ground, the air and the man is, perhaps the more serious problem of the intensive agriculture. The pesticides can reach the aquatic environment through some ways and when in water it is possible to them to penetrate into aquatic organism and cause toxicity. The aim of this study was to evaluate sublethal effects in *Astyanax* sp exposed to herbicides widely used in sugar cane: Roundup[®] and Hexaron WG[®] through the enzyme acetylcholinesterase (AChE) activity in muscle, the enzyme catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) activities and lipid peroxidation in liver, and still through the micronucleus assay and gills histopathology. A number of six groups were used: Control H₂O (CO), Rondup[®] 0,006 ml.L⁻¹ (RA), Roundup[®] 0,003ml.L⁻¹ (RB), Hexaron WG[®] 30 mg.L⁻¹ (H30), Hexaron WG[®] 15 mg.L⁻¹ (H15) and Mixture Roundup[®] 0,003ml.L⁻¹ + Hexaron WG[®] 30 mg.L⁻¹ (MT). The activity of the enzyme AChE, expressed in nmol.mg prot⁻¹, it was inhibited in the group MT(169,2±18,98; p<0,05) when compared to the groups D30 (372,9±40,36) and RB (319,8±43,41). The activity of the catalase, expressed in μmol.min⁻¹.mgproteína⁻¹, decreased in the group D30 (531,1±53,22) compared to the group CO (845,9±76,46; p <0,05). The activity of GST, expressed in nmol.min⁻¹.mgproteína⁻¹, increased in the group D30 (233,8±8,463) when compared to CO group (133,9±3,603; p<0,05). The lipoperoxidation, expressed in nmol.mg prot⁻¹, increased in the groups MT (6,533±0,8831) and RA (4,936±0,3702) compared to CO (2,456±0,1546; p <0,05). The group MT presented higher frequency of nuclear alterations than the group CO. The gills histopathologic analysis did not show differences among the groups. The results of AChE activity showed neurotoxicity when the investigated compounds were mixed, suggesting a possible potentiated effect. The increased activity of the GST indicates that this route of metabolism was activated in the group D30. The results referred to LPO showed membrane damage in fishes from the groups MT and RA that can be related to the increase of nuclear alterations in the group MT. The decrease of CAT activity is possibly to explain due to its inhibition or low production. The mechanisms of essential metal capitation for its synthesis can be involved. The exposure time and used concentrations, probably were not sufficient to cause damages in the gills morphology in order to compromise the structure and the functioning. The results showed that even in low concentrations of the herbicides, it was possible to detect alterations in some of the tested biomarkers.

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 1950, profundas mudanças foram observadas na agricultura tradicional, bem como seus impactos sobre o ambiente. Novas tecnologias, muitas delas baseadas no uso extensivo de agentes químicos, foram disponibilizadas para o controle de doenças, aumento da produtividade, proteção contra pragas agrícolas e plantas daninhas (MOREIRA *et al.*, 2002). Este fato teve como consequência a disposição de novas substâncias no ambiente aquático, e aliado à falta de tratamento dos resíduos líquidos oriundos de tais atividades, fez com que os ecossistemas sofressem alterações em suas funções e proovessem cada vez mais, como esperado, má qualidade da água, diminuição da diversidade biológica e proliferação excessiva de espécies indesejáveis (PASTRO, 1995).

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2006) a contaminação da água, do solo, do ar e do homem por resíduos sólidos e pesticidas talvez seja o problema mais grave da agricultura intensiva. E o primeiro passo para a resolução dos problemas sócio-ambientais gerados pela má gestão dos recursos hídricos é o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico eficientes (BUSS; BAPTISTA; NESSIMIAN, 2003).

Desde a década de 1970, pesquisadores e gestores de recursos hídricos da Europa Ocidental e da América do Norte argumentam que as metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para atender aos usos múltiplos da água, sendo particularmente deficientes na avaliação da qualidade estética, de recreação e ecológica do ambiente (BUSS; BAPTISTA; NESSIMIAN, 2003). Tal objetivo pode ser atingido com uma análise integrada da qualidade da água, ou seja, considerando não apenas as metodologias tradicionais de avaliação, mas os aspectos biológicos do sistema (BARBOSA, 1994).

Biomarcadores têm sido utilizados com a finalidade de se obter informações sobre a qualidade de um determinado ambiente ou parte dele. Segundo Walker e Thompson (1996) esses podem ser definidos como uma resposta aos poluentes ambientais que pode ser mensurada indicando a presença, o efeito, e em alguns

casos, o grau de contaminação. Para tanto, o conhecimento das oscilações dos parâmetros a serem analisados, tanto em situação de normalidade quanto frente ao agente estressor em questão, se faz necessário (JONSSON; CASTRO, 2005).

Neste contexto este trabalho propôs avaliar os efeitos causados pela exposição da espécie *Astyanax* sp a doses subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaron WG®, isolados e misturados, através de biomarcadores bioquímicos, genéticos e morfológicos de contaminação ambiental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PESTICIDAS E CANA-DE-AÇÚCAR

De acordo com o Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, os agrotóxicos, ou pesticidas, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (SINDAG, 2003).

Os pesticidas começaram a ser mais utilizados após a 2ª guerra mundial. A utilização de pesticidas na agricultura nacional em larga escala ocorreu a partir da década de 70 (CUT-RJ, 2006). Segundo dados fornecidos pela Associação Brasileira da indústria Química, em 2004 o Brasil consumiu U\$ 4,2 bilhões em pesticidas. Desta forma, considerando-se o consumo em dez países que representam 70% do mercado mundial de pesticidas, o Brasil aparece em 4º lugar. O emprego de pesticidas nos Estados do Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins representa atualmente 70% do total utilizado no país (ANVISA, 2004).

Segundo Armas, Monteiro e Amancio (2005) a cultura da cana-de-açúcar respondeu, em 2002, por 11,5% das vendas de pesticidas no Brasil, atrás somente da soja. Em 2003, a cultura representou 8,0% das vendas, ocupando a 4ª posição e movimentando 251 milhões de dólares.

Os pesticidas selecionados para o desenvolvimento deste trabalho são herbicidas comumente utilizados na cultura de cana-de-açúcar: Hexaron WG® e Roundup®.

2.2 HEXARON WG®

Hexaron WG® é um herbicida de ação sistêmica, seletivo, pré e pós-emergente inicial. Seus ingredientes ativos são Diuron (468g.Kg⁻¹) e Hexazinona (132 g.Kg⁻¹), possuindo ainda 400g.Kg⁻¹ de ingredientes inertes. Apresenta-se na formulação de grânulos dispersíveis em água, sendo recomendado para a cultura da cana-de-açúcar.

DIURON

O diuron [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia], pertencente ao grupo químico das feniluréias, é recomendado para aplicação em diversas culturas no Brasil, sendo intensivamente aplicado na cultura de cana-de-açúcar (MUSUMECI *et al.*, 1995).

Suas propriedades físicas e químicas incluem solubilidade em água de 42 mg.L⁻¹ em 25°C, não-ionizável, não-volátil (SOUZA; BOEIRA; GOMES, 2000) e tempo de meia-vida no solo (DT₅₀) de 328 + 212 dias (JUNIOR; BRITO; RIBEIRO, 2005).

Sua ação como herbicida se dá por inibir a reação de Hill do fotossistema II bloqueando a fluência elétrica do aceptor primário Q, para a proteína D1 (TEISSEIRE ; VERNET, 2000).

Devido sua alta persistência (de 1 mês a 1 ano) pode ser encontrado em vários ambientes como solo, sedimentos e água (FIELD *et al.*, 2003). A dispersão deste componente na agricultura, leva a poluição do ambiente aquático principalmente por lixiviação no solo (THURMAN; BASTIAN; MOLLHAGEN. 2000). Segundo Nitschke e Schüssler (1998), em algumas cidades da Alemanha, o diuron representou 80% do total de herbicidas encontrados nos efluentes de estação de tratamento de água. E é considerado como uma substância “Prioritariamente Perigosa” pela comissão européia (MALATO *et al.*, 2002).

Índice monográfico do Diuron, segundo Anvisa (2006)

a) Ingrediente ativo ou nome comum: diuron

- b) Nome químico: 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
 c) Fórmula bruta: C₉H₁₀Cl₂N₂O
 d) Fórmula estrutural:

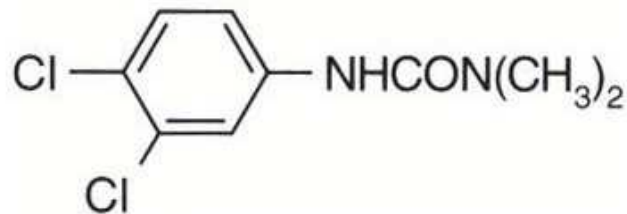


FIGURA 1 – Fórmula Estrutural do herbicida Diuron

- e) Grupo químico: Uréia
 f) Classe: Herbicida
 g) Classificação toxicológica: Classe III

HEXAZINONA

O herbicida Hexazinona (3-cyclohexyl-6-dimethylamino-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione) é uma s-triazina de amplo espectro de ação usado para o controle de uma grande variedade de plantas daninhas (WANG; WANG; TAN, 2005). Pode ser absorvido pelas raízes da planta ou pelas folhas, atuando como inibidor da fotossíntese. Hexazinona é bastante solúvel em água (33 g.L⁻¹) e móvel no solo, com grande potencial de carreamento, sendo considerado um importante contaminante de águas (WANG; WANG; TAN, 2005). A hidrólise da hexazinona foi descrita por Zhonglin, Zhengjun e Daoji (1998), que observaram que esta é muito lenta tendo meia-vida superior a 1 ano, em solução tampão com pHs de 5 a 9.

Peterson, Boutin e Freemark (1997) avaliaram a toxicidade do hexazinona em algas verdes, diatomáceas, cianobactérias e plantas flutuantes, e encontrou que todos estes são sensíveis a este herbicida.

Não foram encontrados experimentos correlacionando este herbicida com os biomarcadores utilizados neste trabalho.

Índice monográfico da Hexazinona, segundo Anvisa (2006)

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: Hexazinona
 b) Nome químico: 3-cyclohexyl-6-dimethylamino-1-methyl-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione
 c) Fórmula bruta: C₁₂H₂₀N₄O₂
 d) Fórmula estrutural:

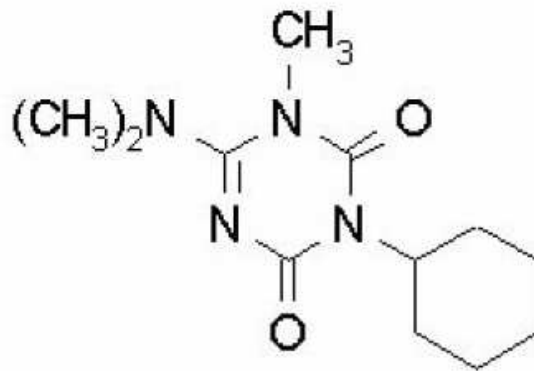


FIGURA 2 – Fórmula Estrutural do herbicida Hexazinona

- e) Grupo químico: Triazinona
 f) Classe: Herbicida
 g) Classificação toxicológica: Classe III

2.3 ROUNDUP®

A substância ativa do herbicida Roundup® é o Glifosato (N-(phosphonomethyl) glicine), que foi criado em 1950 pelo Dr. Henri Martin, químico suíço, como um potente “agente complexo”. E em 1970, o Dr. JE Franz da Companhia Monsanto descobriu sua ampla atividade herbicida, vindo no ano seguinte a lançar no mercado o produto comercial Roundup® (SMITH; OEHME, 1992). O Brasil recebeu sua primeira amostra para testes em 1972 e em 1978 o produto, ainda importado, chegava ao país para ser comercializado, e só passou a ser produzido no Brasil em 1984 (MONSANTO, 2006).

Além da substância ativa, glifosato (480g.L⁻¹, correspondente a 356g.L⁻¹ do equivalente ácido), o Roundup® apresenta como ingredientes inertes água e um

surfactante, o polioxietilenamina, que ajuda o glifosato a penetrar na folha das plantas, sendo assim um herbicida ativo (PASTRO, 1995).

Folmar, Sanders e Julin (1979) trataram diversas espécies de peixes com Roundup[®], Glifosato comercial e o surfactante. O Glifosato se mostrou menos tóxico que o Roundup[®] ou o surfactante, e a toxicidade do Roundup[®] foi similar a do surfactante.

A ação herbicida do Roundup[®] se dá pelo bloqueio da síntese de um aminoácido aromático essencial, e do metabolismo de compostos fenólicos, influenciando diretamente a síntese protéica e a formação dos tecidos da planta, resultando em parada do crescimento, disfunção celular e conseqüente morte da planta (PASTRO, 1995).

O glifosato é bastante solúvel em água em torno de 12 g.L^{-1} , e pode se complexar com íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} e Cu^{2+} em corpos hídricos, sendo carregado para o fundo onde se adere fortemente às partículas de sedimento (PASTRO, 1995).

Pesquisas sobre a degradação deste princípio ativo indicam que a taxa de biodegradação pode variar substancialmente, dependendo das condições ambientais em estudo (PASTRO, 1995). Segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization – WHO, 1994) o tempo necessário para a biodegradação do glifosato em água, sob condições aeróbias, é inferior a 14 dias, enquanto que em condições anaeróbias esse tempo varia entre 14 e 21 dias. Ainda segundo a WHO (1994), o glifosato é pouco bioacumulável em organismos aquáticos, devido sua alta solubilidade em água e caráter iônico. Estudos realizados em campo onde foi aplicado glifosato na água, nas concentrações de 1,3 a 1,4 Kg de glifosato.ha⁻¹, foi detectado o valor máximo de 0,21 mg.Kg⁻¹ do glifosato em carpas após 30 dias e decrescendo para 0,1mg.Kg⁻¹ após outros 30 dias (WHO, 1994).

Segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente n°357 (CONAMA, 2005) o limite para o glifosato em águas de Classe I (indicadas para consumo humano; recreação de contato primário; irrigação de hortaliças e proteção de comunidades aquáticas) é de $65 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para águas de Classe III (irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de contato secundário e dessedentação de animais) $280 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Índice monográfico do Glifosato, segundo Anvisa (2006)

- a) Ingrediente ativo ou nome comum: glifosato
- b) Nome químico: N-(phosphonomethyl)glycine
- c) Fórmula bruta: C₃H₈NO₅P
- d) Fórmula estrutural:

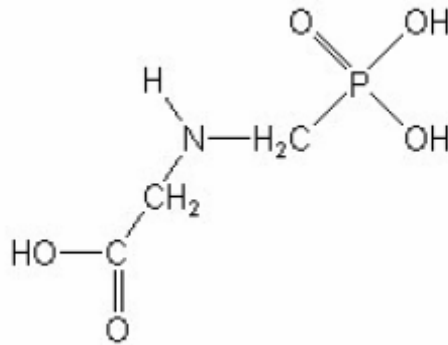


FIGURA 3 – Fórmula Estrutural a substância ativa do herbicida Roundup[®], o Glifosato

- e) Grupo químico: Glicina substituída
- f) Classe: Herbicida
- g) Classificação toxicológica: Classe IV

2.4 CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA POR PESTICIDAS

A preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por pesticidas tem crescido no meio científico.

Segundo a Embrapa (2006) a contaminação da água, do solo, do ar e do homem por resíduos sólidos e pesticidas talvez seja o problema mais grave da agricultura intensiva.

Estudos desenvolvidos em várias regiões do mundo têm mostrado que a porcentagem dos produtos utilizados na agricultura que atingem os ambientes aquáticos é geralmente baixa (HIGASHI, 1991). Entretanto, pesticidas persistentes e com grande mobilidade no ambiente têm sido detectados em águas superficiais e subterrâneas (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001). Mesmo em concentrações

baixas, os pesticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes, portanto, não existe nível seguro previsível para pesticidas em água quando pode ocorrer biomagnificação (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001).

Como dito anteriormente os pesticidas podem alcançar os ambientes aquáticos através da aplicação intencional, lixiviação, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações, como mostra a figura 4.

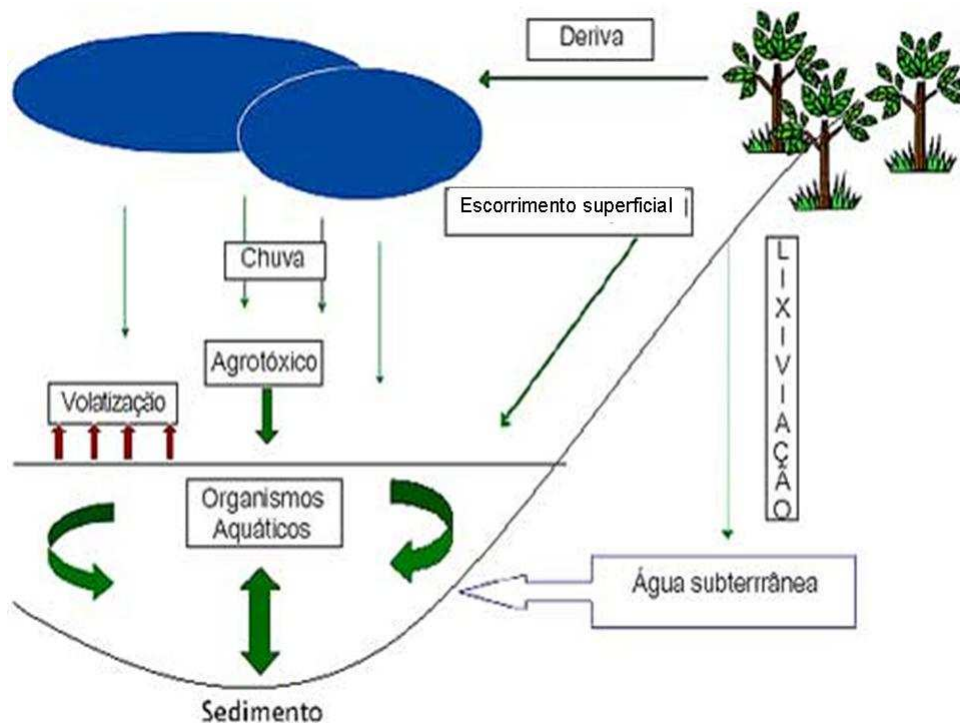


FIGURA 4 - Movimentos dos pesticidas para ambientes aquáticos.

FONTE: TOMITA, 2002.

Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas o resíduo do pesticida pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser destoxificados ou acumulados. Eles podem ser transportados através do sistema aquático por difusão nas correntes de água ou nos corpos dos organismos aquáticos. Alguns pesticidas e/ou metabólitos podem também retornar à atmosfera por volatilização (TOMITA, 2002).

2.5 BIOMARCADORES

A necessidade da detecção dos efeitos subletais dos tóxicos sobre os organismos levou ao desenvolvimento dos biomarcadores, os quais são alterações biológicas que expressam a exposição e/ou o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (WALKER; THOMPSON, 1996). Existem assim biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes.

Os biomarcadores podem ser classificados como de exposição ou de efeito. Um biomarcador de exposição será qualquer alteração biológica mensurável que evidencie a exposição dos organismos a um poluente. Alguns exemplos deste tipo de marcadores são a atividade de enzimas antioxidantes e a concentração de metalotioneínas. Biomarcadores de efeito serão aqueles que evidenciem algum efeito tóxico associado à exposição do organismo ao poluente, como por exemplo, a peroxidação de lipídios ou o dano de DNA (CEM-MILÊNIO, 2005).

Os biomarcadores utilizados neste estudo foram os biomarcadores bioquímicos: atividade das enzimas glutaciona S-transferase (GST), catalase (CAT), acetilcolinesterase (AChE), lipoperoxidação lipídica (LPO); Biomarcador genético: ensaio de micronúcleo; Biomarcador morfológico: histopatologia de brânquias.

2.5.1 Biomarcadores Bioquímicos

Glutaciona S-transferase

A transformação metabólica dos compostos químicos nos organismos é essencial para alterar a atividade biológica do composto e, conseqüentemente, cessar a interação entre o elemento químico e a célula. O metabolismo ou biotransformação inclui numerosos sistemas enzimáticos diferentes, os quais atuam em diversos tipos de substratos. Muitas destas enzimas têm em comum a função de converter estruturas tóxicas para menos tóxicas, e converter químicos lipofílicos em estruturas hidrofílicas, que são mais rapidamente excretadas.

O metabolismo envolve dois tipos de reações bioquímicas, conhecidas como reações de fase I e reações de fase II. Com frequência mas não invariavelmente essas reações ocorrem sequencialmente (RANG *et al.*, 2004).

As reações de fase I são catabólicas (oxidação, redução, hidrólise), e com frequência os produtos são quimicamente mais reativos e, portanto, paradoxalmente, algumas vezes mais tóxicos ou carcinogênicos que a substância original. As reações de fase II são anabólicas, e envolvem conjugação, que habitualmente resultam em produtos inativos, embora hajam exceções (RANG *et al.*, 2004). Com frequência, as reações de fase I introduzem um grupo relativamente reativo, como o hidroxila. A seguir este grupamento, atua como ponto de ataque para o sistema de conjugação (RANG *et al.*, 2004).

A enzima Glutathione S-transferase (GST) pertence à fase II do metabolismo sendo responsável pela conjugação de componentes eletrofílicos ou oriundos da fase I com a glutathione reduzida (GSH) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2002). A GSH é formada pelos aminoácidos glicina, cisteína e glutamato, e atua então como co-fator para a GST (TORRES; SOARES; MAIA, 2004). A capacidade redutora da GSH é determinada pelo grupamento SH, presente na cisteína (TORRES; SOARES; MAIA, 2004). A família das enzimas GSTs é caracterizada por ter uma ampla especificidade de substrato com baixa afinidade. Esta baixa eficiência catalítica teve importante papel na evolução das GSTs como agente desintoxicador de amplo espectro, tanto de componentes endógenos quanto exógenos (TEW; RONAI, 1999). A atividade desta enzima pode ser indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que ela utiliza como co-fator o GSH, e este também participa da degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da atuação da enzima Glutathione peroxidase (GPx), para isso a associação de outros biomarcadores de estresse oxidativo são necessários.

Catalase

A catalase que é uma enzima intracelular localizada no peroxissomo, contendo grupo heme, que facilitam a remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), metabolizando este em oxigênio (O_2) e água (H_2O) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2002). O peróxido de hidrogênio é um exemplo de espécie reativa de oxigênio, que assim como os radicais livres são formados durante o metabolismo oxidativo e de xenobiontes.

Denomina-se radical livre toda molécula que possui um elétron ímpar em sua órbita externa. Este elétron livre favorece a recepção de outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reativos, inclusive com moléculas orgânicas. Os radicais livres têm vida média de milésimos de segundo, mas eventualmente podem tornar-se estáveis ao reagirem com biomoléculas. Espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) são compostos igualmente reativos quanto os radicais livres, porém não possuem elétrons desemparelhados na órbita externa, e portanto não podem ser classificados como radicais livres, sendo então chamadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), um exemplo é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No nosso organismo, as espécies reativas são normalmente produzidos pelas células durante os processos metabólicos, entretanto, sob condições normais nosso organismo possui enzimas protetoras, ou antioxidantes que reparam 99% dos danos causados pela oxidação.

O desequilíbrio entre a produção de ERO/ERN e remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ERO/ERN que causa danos às estruturas celulares, podendo levar a inativações enzimáticas, peroxidação lipídica (LPO), danos de DNA, até a morte celular (VANCINI *et al.*, 2005). Muitos contaminantes ambientais (ou seus metabólitos) têm sido relatados por causar estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2002).

Os efeitos mediados pela oxidação, assim como suas respostas adaptativas, como o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e concentração de

componentes não enzimáticos, são potentes biomarcadores de toxicidade (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2002).

Os sistemas de defesa antioxidante incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione dissulfeto redutase (GR), e antioxidantes de baixo peso molecular, como o GSH, β -caroteno, ácido ascórbico, α -tocoferol (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2002).

Lipoperoxidação

A lipoperoxidação tem se mostrado um potencial biomarcador de contaminação ambiental (STEGEMAN *et al.*, 1992; HAI, VARGA; MATKOVICS, 1995), através dela podemos inferir sobre os danos causados as células pelo estresse oxidativo (KAPPUS, 1987).

O processo de peroxidação lipídica ocorre por uma reação em cadeia, e demonstra a habilidade de uma única espécie radicalar em propagar reações bioquímicas deletérias (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2002). Quando um radical livre qualquer interage com um ácido graxo insaturado da membrana celular, ocorre o seqüestro um átomo de hidrogênio resultando na formação de um radical lipídico, este reage com O_2 , abundante nas regiões de membrana, gerando um radical peroxila, que por sua vez irá seqüestrar um átomo de hidrogênio de um novo ácido graxo formando hidroperóxido e um novo radical lipídico que dará continuidade a reação em cadeia (Figura 5).

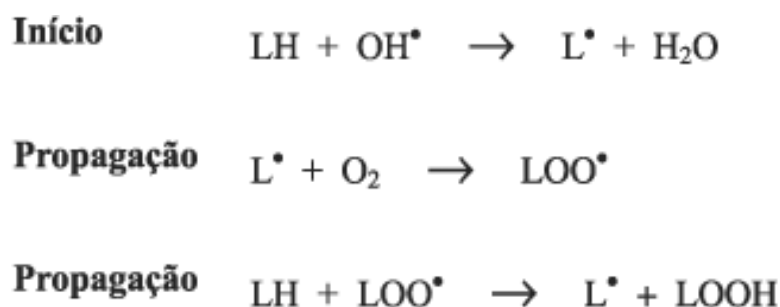


FIGURA 5 - Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação (LH: ácido graxo insaturado; OH^\bullet : radical livre; L^\bullet : radical lipídico, LOO^\bullet : Radical peroxila e LOOH : hidroperóxido lipídico.
 FONTE: GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICCOLO, 2007.

As conseqüências mais comuns da LPO correspondem à perturbação das funções essenciais das membranas celulares e organelas. Incluindo o processo de transporte, a transdução de sinais mediada por receptores e a preservação do gradiente de íons e metabólitos (REBELLO, 2005).

Acetilcolinesterase (AChE)

Com respeito a funções neurais, as enzimas de interesse são as colinesterases (ChE) (PAYNE *et al.*, 1996). Dois tipos de colinesterases são conhecidos, aquelas de alta afinidade pela acetilcolina (acetilcolinesterase - AChE), e aquelas de baixa afinidade (butirilcolinesterase - BChE) (WALKER; THOMPSON, 1991; STURM *et al.*, 2000). Peixes possuem somente AChE no cérebro, enquanto no músculo ambas são encontradas (STURM *et al.*, 2000). AChE está envolvida na desativação da acetilcolina na fenda sináptica, prevenido o estímulo contínuo do neurônio, o que é vital para o funcionamento normal do sistema sensorial e motor (PAYNE *et al.*, 1996).

Compostos como os inseticidas organofosforados e carbamatos inibem a colinesterase de maneira irreversível e reversível, respectivamente. Outros compostos como metais pesados e organoclorados parecem também inibi-la, porém a concentração necessária para promover esse efeito é relativamente mais alta (STURM *et al.*, 2000).

A medida da atividade da ChE é muito utilizada para diagnosticar exposição a tóxicos anticolinesterásicos em peixes, e pode ser considerado um dos mais antigos biomarcadores (SILVA DE ASSIS, 1998; STURM, *et al.*, 2000).

Apesar da inibição da colinesterase ser um biomarcador mais específico de exposição aos organofosfatos ou carbamatos, é de suma importância a investigação da atuação de outras substâncias sobre a atividade da mesma.

2.5.2 Micronúcleo Písceo

O estudo de danos no DNA em nível cromossômico é uma parte essencial da genética toxicológica, uma vez que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese (RIBEIRO, 2003).

O teste do micronúcleo é uma rápida medida para avaliar qualitativamente a quebra cromossômica, e tem sido proposto como um método para rastrear químicos mutagênicos (AL-SABTI, 1991).

Micronúcleos são formados pela condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou por cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal durante a anáfase. E podem ser utilizados como um sensível método para examinar a exposição de peixes a agentes genotóxicos (AL-SABTI, 1991), uma vez que estes podem causar quebras no DNA podendo originar fragmentos acêntricos, e levar a formações de neoplasias.

Winston e Di Giulio (1991) encontraram elevados níveis de neoplasias em peixes que habitavam ambientes poluídos, o que foi associado com o aumento do estresse oxidativo causado pela exposição aos poluentes.

2.5.3 Histopatologia de Brânquias

Segundo Fent, 1996, os efeitos nas estruturas das células e tecidos constituem um importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos. As características histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (SCHMALZ *et al.*, 2002). Wester e Canton (1991), relatam que através da morfologia é possível tanto revelar os órgãos alvos mais afetados quanto detectar a sensibilidade do organismo em relação aos níveis tóxicos dos contaminantes aos quais foram expostos. A histopatologia permite, ainda, diferenciar lesões promovidas por doenças daquelas induzidas por outros fatores ambientais como a exposição a poluentes (SCHWAIGER *et al.*, 1997).

A histopatologia de brânquias é um importante biomarcador, uma vez que essas estruturas estão em contato direto e constante com a água do meio. As brânquias formam o sistema respiratório dos peixes e estão organizadas de forma realizar as trocas gasosas necessárias eficientemente. E para que isso ocorra, é necessária a exposição de um sistema de capilares à água, fato este que torna o tecido extremamente vulnerável em relação ao meio ambiente. Partículas como

sedimentos, parasitas e/ou xenobióticos podem, dessa forma, causar efeitos prejudiciais às brânquias mais facilmente.

As brânquias da maioria dos teleósteos são compostas geralmente por quatro pares de arcos branquiais, que são sustentados por um esqueleto ósseo. Dos arcos branquiais partem filamentos sustentados por cartilagem (lamelas primárias), das quais partem as lamelas secundárias. As lamelas secundárias são constituídas por um epitélio simples, no qual ocorrem as trocas gasosas.

As brânquias são revestidas por um epitélio do tipo pavimentoso. Ele apresenta-se liso na região da lamela secundária e com microsaliências na região da lamela primária. As lamelas primárias são sustentadas por tecido cartilaginoso e possuem muitos vasos sanguíneos. As lamelas secundárias, por sua vez, são constituídas por três camadas de células: duas de células pavimentosas (externas) e uma camada intermediária constituída de células pilares. Os prolongamentos das células pilares formam os capilares, através dos quais ocorrem as trocas gasosas (SILVA, 2004).

2.6 MODELO BIOLÓGICO

No presente estudo foram utilizados peixes popularmente conhecidos como lambaris (Figura 6), pertencentes ao gênero *Astyanax*, subfamília Tetragonopterinae, família Characidae (NOMURA, 1975). São estritamente de água doce, possuem escamas, são de pequeno porte, raramente ultrapassando 10 cm de comprimento total, e sua coloração é bastante variada (SILVA, 2004). Forrageiam em todos os níveis tróficos e exibem ampla habilidade em mudar de presa como resposta às mudanças ambientais (LOBÓN-ERVIÁ; BENNEMANN, 2000). A distribuição geográfica do gênero em questão se dá nas bacias Amazônicas, Araguaia-Tocantins, São Francisco, Prata e Atlântico Sul.

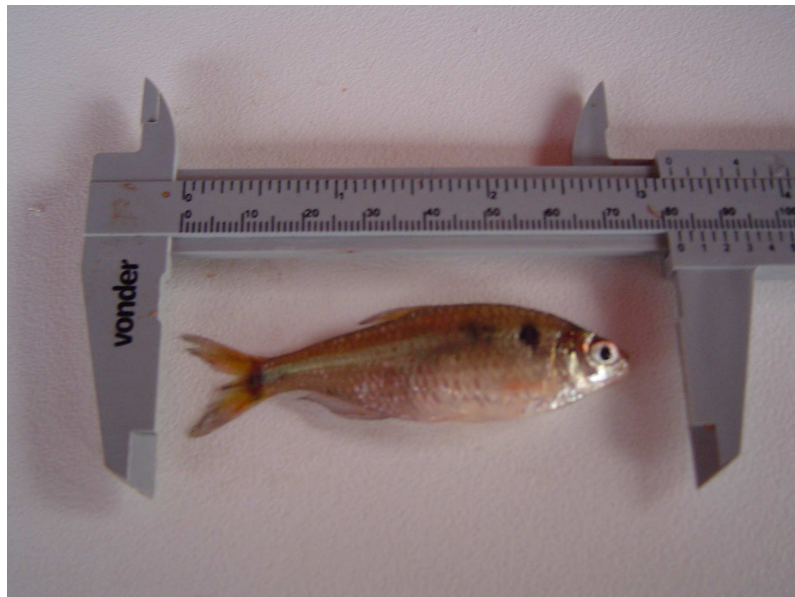


FIGURA 6 – Modelo Biológico - *Astyanax* sp.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos subletais da exposição da espécie *Astyanax* sp a dois pesticidas, através de biomarcadores de contaminação ambiental.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos causados pelo herbicida Roundup[®] na espécie *Astyanax* sp, através da atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST) e do ensaio de micronúcleo, lipoperoxidação lipídica (LPO) e histopatologia de brânquias.
- Avaliar os efeitos causados pelo herbicida Hexaron WG[®] na espécie *Astyanax* sp, através da atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST) e do ensaio de micronúcleo e lipoperoxidação lipídica (LPO) e histopatologia de brânquias.
- Avaliar os efeitos causados pela mistura dos herbicidas Roundup[®] e Hexaron WG[®] na espécie *Astyanax* sp, através da atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT) e do ensaio de micronúcleo e lipoperoxidação lipídica (LPO) e histopatologia de brânquias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os animais foram comprados na piscicultura Água Verde localizada no município de Araucária – PR, transportados em sacos plásticos com aeração adequada até o laboratório de Toxicologia Ambiental do departamento de Farmacologia da UFPR, onde foram aclimatados durante 15 dias no laboratório, com temperatura em torno de 23⁰ C, aeração constante, ciclo claro/escuro de 12 horas e receberam ração comercial diariamente.

4.2 PRÉ – EXPERIMENTO I - ROUNDUP®

Após o período de aclimação os animais foram distribuídos randomicamente em 4 grupos para a detecção da concentração subletal, estes foram compostos por 5 animais cada e dispostos em aquários de 20 litros.

Grupos:

- ❖ CONTROLE: Água (solvente).
- ❖ ROUNDUP® 0,03 ml roundup.L⁻¹
- ❖ ROUNDUP® 0,02 ml roundup.L⁻¹
- ❖ ROUNDUP® 0,006 ml roundup.L⁻¹

O início do experimento se deu com a exposição dos animais aos agentes tóxicos através da água contaminada. O experimento teve duração de 96 horas e neste período os peixes não foram alimentados.

4.3 PRÉ – EXPERIMENTO II – HEXARON WG®

Após o período de aclimação os animais foram distribuídos randomicamente em 4 grupos para a detecção da concentração subletal, estes foram compostos por 5 animais cada e dispostos em aquários de 20 litros.

Grupos:

- ❖ CONTROLE: Água
- ❖ HEXARON WG® 100 mg.L⁻¹
- ❖ HEXARON WG® 60 mg.L⁻¹
- ❖ HEXARON WG® 30 mg.L⁻¹

O início do experimento se deu com a exposição dos animais aos agentes tóxicos através da água contaminada. O experimento teve duração de 96 horas e neste período os peixes não foram alimentados.

4.4 EXPERIMENTOS ROUNDUP®, HEXARON WG® E MISTURA

Após o período de aclimação os animais foram distribuídos randomicamente em 7 grupos, os quais foram compostos por 20 animais cada e dispostos em aquários de 20 litros.

Grupos:

- ❖ CONTROLE: Água (controle)
- ❖ ROUNDUP®: 0,006 ml.L⁻¹ (RA)
- ❖ ROUNDUP®: 0,003ml.L⁻¹ (RB)
- ❖ HEXARON WG®: 30 mg.L⁻¹ (H30)
- ❖ HEXARON WG®: 15 mg.L⁻¹ (H15)
- ❖ MISTURA (roundup® 0,006 ml.L⁻¹ e hexaron WG® 30 mg.L⁻¹) (mistura)

O início do experimento se deu com a exposição dos animais aos agentes tóxicos através da água contaminada. O experimento teve duração de 96 horas e neste período os peixes não foram alimentados.

4.4.1 Processamento do material

Após as 96 horas de exposição os peixes foram então sacrificados através de secção medular, pesados e medidos. O sangue, de 12 indivíduos, foi coletado com o auxílio de um tubo capilar para hematócrito, para o ensaio de micronúcleo. Os fígados foram retirados e agrupados em número de dois, formando 10 pools e em seguida armazenados em freezer -70°C para análise da atividade da GST, CAT e LPO. Um fragmento de músculo foi retirado de cada animal e acondicionado em freezer -20°C para a medida da atividade AChE. O segundo arco branquial do lado direito de 12 indivíduos foi cuidadosamente retirado e fixado em ALFAC (álcool 80%, formaldeído 40% e ácido acético glacial 5%) por 16 horas para histopatologia.

4.4.2 Extração Enzimática

As amostras de músculo foram descongeladas em gelo moído e pesadas, aproximadamente 100mg. Essas amostras foram homogeneizadas em 2ml de tampão fosfato 0,1M pH7,5, com o auxílio do homogeneizador automático Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 10000 x g a 4°C, obtendo assim o sobrenadante, no qual foi medida a atividade da acetilcolinesterase e dosagem de proteínas totais.

As amostras de fígado, pools de 2 fígados foram descongeladas em gelo moído e pesadas. Cada pool foi homogeneizado em tampão fosfato 0,1M pH6,5 na proporção 1:10 (peso/volume), com o auxílio do homogeneizador automático Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 10000 x g a 4°C, obtendo assim o sobrenadante, do qual foram retiradas quatro alíquotas para a atividade da GST, LPO, CAT, e dosagem de proteínas totais.

4.4.3 Atividade da Acetilcolinesterase

O sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído em tampão fosfato 0,1M pH7,5 na proporção 1:10 (volume/volume), e 50 µl deste foi colocado na microplaca, em seguida 200 µl de DTNB (0,75 mM) e 50 µl de ATC (iodeto de acetiltiocolina 9 mM), o último foi adicionado imediatamente antes da leitura. Foram lidas 4 réplicas de cada amostra. Tais valores foram estabelecidos através de padronização prévia.

A atividade da AChE foi medida segundo o método Ellman *et.al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), em comprimento de onda de 405nm no espectrofotômetro Sunrise – TECAN. E consiste na determinação da taxa de produção de tiocolina. O substrato iodeto de acetiltiocolina, é hidrolizado pela enzima liberando tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o íon 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (I) para produzir o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato (II) (Figura 6).

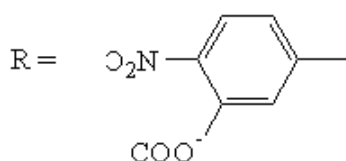
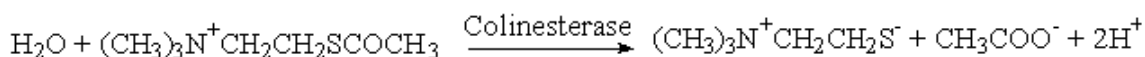


FIGURA 7 - Fundamento do método de Ellman et al. (1961)
Fonte: CEM-UFPR, 2006

4.4.4 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST foi mensurada através do aumento da absorbância resultante da formação de um tioéter pelos substratos GSH (molécula endobiótica) e

1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, substrato sintético não específico utilizado para determinar praticamente todas as isoformas de GST já identificadas em mamíferos) (FILIPAK NETO, 2007).

Para tanto o sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído na proporção 1:10 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1M pH 6,5, e 100µl deste foi pipetado nas microplacas, em seguida foram adicionados 200 µl de solução reação (CDNB 2,5 mM, GSH 2 mM em tampão fosfato 0,1M pH 6,5) imediatamente antes da leitura. Quatro réplicas de cada amostra foram lidas a 340nm, em espectrofotômetro de microplaca Sunrise – TECAN

4.4.5 Atividade da Catalase

Para a atividade da Catalase, o sobrenadante resultante da centrifugação foi diluído na proporção 1:5 (volume/volume) em tampão fosfato 0,1M pH 6,5. As amostras de enzima foram pipetadas em cubetas de quartzo (10µl), em seguida foram adicionados 990 µl de solução reação 20mM (Tampão Tris 1 M / EDTA 5mM pH8,0, peróxido de hidrogênio 30% e água miliqué, em concentrações específicas e mantida em banho-maria a 25°C), foram lidas 3 réplicas de cada amostra. O método consiste em mensurar a atividade da catalase através do consumo de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectrofotometria (AEBI, 1984). A absorvância foi medida em comprimento de onda de 240 nm no espectrofotômetro Ultrospec 2000, UV/Visible - Pharmacia Biotec.

4.4.6 Lipoperoxidação (LPO)

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi verificada pelo método de FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*) que tem por princípio a rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} - laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do

estabilizador hidroxitolueno butilato (BHT) tal método foi proposto por Jiang, Hunt e Wolff, 1992 (FILIPAK NETO, 2007).

Para tanto o sobrenadante resultante da centrifugação foi ressuspenso em metanol PA na proporção 1:2 (volume/volume), sonificado durante 1 minuto, e então centrifugado 10 minutos a 10000 x g a 4°C. Em seguida 30 µl do sobrenadante resultante foi pipetado em microplacas e incubado por cerca de trinta minutos com 270 µl de solução reação (metanol grau HPLC 90% do volume final, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 25mM, Butyl hidroxitolueno (BHT) 4mM, sulfato ferroso amoniacal 250 µM, e laranja de xilenol 1mM). Quatro réplicas de cada amostra foram lidas a 570nm, em espectrofotômetro de microplaca Sunrise – TECAN.

4.4.7 Concentração protéica

Os dados de atividades enzimáticas foram normalizados pelas respectivas concentrações protéicas totais. Tais valores foram quantificados pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina como padrão.

4.4.8 Teste de Micronúcleo Písceo

Uma gota de sangue de cada indivíduo foi distendida sobre uma lâmina, após sua secagem as lâminas foram fixadas em etanol PA (MERCK®) por 30 minutos, e coradas com GIEMSA 10%. Foram contados 2000 núcleos por lâmina.

4.4.9 Histologia de Brânquias

Após fixação em ALFAC, brânquias foram desidratadas em série crescente de álcoois: 1 hora em 80%, 1 hora em 90%, 1 hora em 95%, 1 hora em 100%, 30 minutos em 100% O material foi diafanizado usando-se xilol P.A. e álcool 100% na proporção 1:1 durante 1 hora, em seguida xilol P.A. por mais uma hora. A inclusão se deu em paraplast a 56°C por 2 horas.

Para a microtomia o material foi mantido em freezer por 15 minutos, a fim de facilitar a obtenção dos cortes. Os cortes foram afixados às lâminas com albumina 1% e distendidos sobre uma chapa quente.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina 1%. Para o processo de coloração as lâminas foram diafanizadas em xilol (dois banhos de 5 minutos cada), em seguida, hidratadas em série crescente de álcoois e então coradas. As lâminas analisadas em microscópio ótico e os resultados foram gravados em imagens digitalizadas através do fotomicroscópio *Axiophot Zeiss*.

As lesões observadas foram: a presença de descolamento epitelial, de hiperplasia das células da lamela primária, de fusão lamelar, de bifurcação das lamelas, de parasitas e de aneurismas. A análise destes parâmetros foi apenas descritiva.

4.4.10 Estatística

Os resultados das atividades enzimáticas foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) critério único, seguido pelo teste de Bonferroni. Para os resultados das alterações genéticas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. A regra de decisão (α) foi de 0,05 para todos os testes aplicados. A análise histopatológica das brânquias foi apenas descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 PRÉ – EXPERIMENTO I – ROUNDUP®

Durante as 96 horas de exposição os animais do grupo $0,006 \text{ mL.L}^{-1}$ apresentaram poucos sinais de intoxicação, apenas diminuição da natação e aumento da frequência respiratória, enquanto todos os animais dos grupos $0,03$ e $0,02 \text{ mL.L}^{-1}$ morreram. Com isso as concentrações adotadas para o experimento com o herbicida Roundup® foram $0,006 \text{ mL.L}^{-1}$, e 50% desta, $0,003 \text{ mL.L}^{-1}$.

5.2 PRÉ – EXPERIMENTO II – HEXARON WG®

Durante as 96 horas de exposição todos os animais apresentaram sinais de intoxicação, e a intensidade destes variou com a concentração do herbicida na água, sendo mais acentuada no grupo 100 mg.L^{-1} . Aproximadamente 12 horas após a exposição todos os animais perderam o equilíbrio e passaram a nadar desordenadamente. Ao final do experimento apenas os animais do grupo controle e do grupo 30 mg.L^{-1} sobreviveram. Com isso as concentrações adotadas para o experimento com o hexaron WG® foram 30 mg.L^{-1} e 15 mg.L^{-1} .

5.3 EXPERIMENTOS ROUNDUP®, HEXARON WG® E MISTURA

5.3.1 Atividade da GST

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos submetidos ao herbicida Roundup® (média \pm erro padrão / RA: $136,9 \pm 7,345$ / RB: $124,7 \pm 9,916$) em comparação ao grupo controle ($133,9 \pm 3,603$), bem como não foram observadas diferenças dos mesmos em relação ao grupo mistura ($112,5 \pm 5,431$) (Figura 8). Os animais submetidos ao herbicida hexaron WG® na concentração de 30 mg.L^{-1} tiveram a atividade da GST aumentada ($233,8 \pm 8,463$) em comparação ao grupo controle ($133,9 \pm 3,603$), mistura ($112,5 \pm 5,431$) e Hexaron WG® 15 mg.L^{-1} ($110,6 \pm 11,84$; $p < 0,05$) (Figura 9).

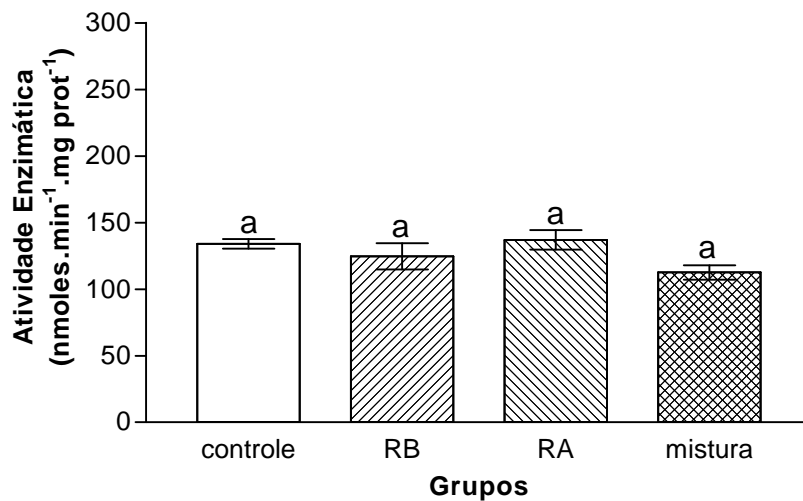


FIGURA 8 – Atividade específica da GST em *Astyanax sp* expostos ao herbicida Roundup[®] e a mistura deste com o herbicida Hexaron WG[®]. Os resultados expressam média \pm erro padrão (N=10). RB: Roundup[®] 0,003 mL.L⁻¹, RA: Roundup[®] 0,006 mL.L⁻¹, Mistura: Roundup[®] 0,006 mg.L⁻¹ + hexaron WG[®] 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais.

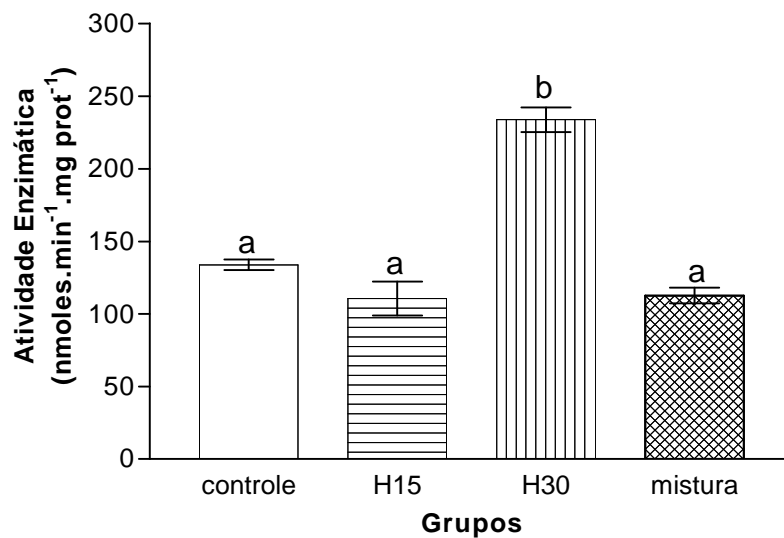


FIGURA 9 – Atividade específica da GST em *Astyanax sp* expostos ao herbicida Hexaron WG[®] e a mistura deste com o herbicida Roundup[®]. Os resultados expressam média \pm erro padrão (N=10). H15: Hexaron WG[®] 15mg.L⁻¹, H30: Hexaron WG[®] 30mg.L⁻¹. Mistura: Roundup[®] 0,006 mg.L⁻¹ + hexaron WG[®] 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

5.3.2 Atividade da CAT

Não foram observadas diferenças significativas nos grupos expostos ao herbicida Roundup® (média \pm erro padrão / RA: 817,5 \pm 65,03 / RB: 797,8 \pm 80,39) em comparação ao grupo controle (845,9 \pm 76,46), bem como dos mesmos em relação ao grupo mistura (873,8 \pm 43,85) (Figura 10). Os animais expostos ao herbicida hexaron WG® na concentração de 30 mg.L⁻¹ (531,1 \pm 53,22) tiveram a atividade da CAT diminuída em comparação ao grupo controle (845,9 \pm 76,46), mistura (873,8 \pm 43,85) e hexaron WG® 15 mg.L⁻¹ (944,1 \pm 74,06; p<0,05) (Figura 11).

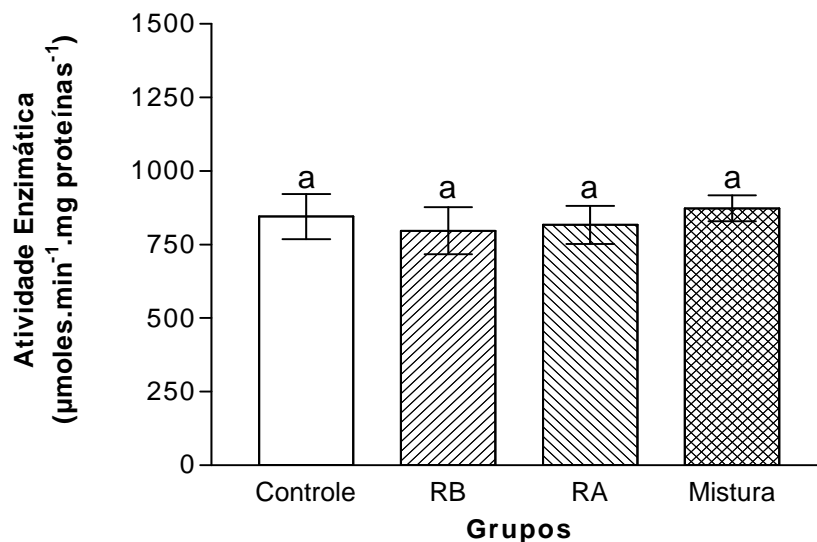


FIGURA 10 – Atividade específica da CAT em *Astyanax sp* expostos ao herbicida Roundup® e a mistura deste com o herbicida Hexaron WG®. Os resultados expressam média \pm erro padrão (N=10). RB: Roundup® 0,003 ml.L⁻¹, RA: Roundup® 0,006 ml.L⁻¹, Mistura: roundup® 0,006 mg.L⁻¹ + hexaron WG® 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais.

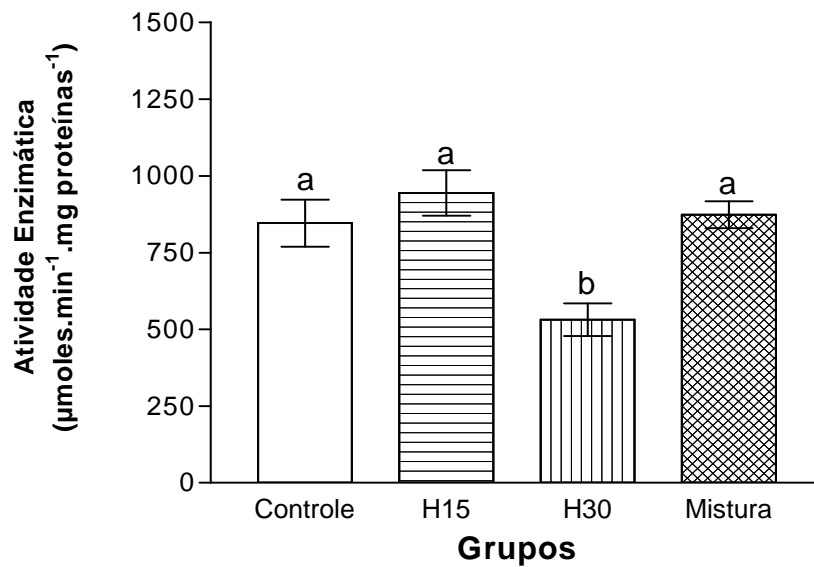


FIGURA 11 – Atividade específica da CAT em *Astyanax sp* expostos ao herbicida Hexaron WG[®] e a mistura deste com o herbicida Roundup[®]. Os resultados expressam média \pm erro padrão (N=10). H15: hexaron WG[®] 15mg.L⁻¹, H30: hexaron WG[®] 30mg.L⁻¹. Mistura: roundup[®] 0,006 mg.L⁻¹ + hexaron WG[®] 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

5.3.3 Lipoperoxidação

O grupo controle (média \pm erro padrão / 2,456 \pm 0,1546) apresentou menor concentração de hidroperóxidos que os grupos Roundup[®] RA (4,936 \pm 0,3702) e Mistura (6,533 \pm 0,8831; $p < 0,05$), e o grupo RB (3,587 \pm 0,4199; $p < 0,05$) só foi estatisticamente menor que grupo mistura (Figura 12). Quanto aos animais expostos ao herbicida hexaron WG[®] (H15: 3,543 \pm 0,4166 / H30: 3,255 \pm 0,6791) apenas o grupo mistura diferiu estatisticamente dos demais (6,533 \pm 0,8831; $p < 0,05$) (Figura 13).

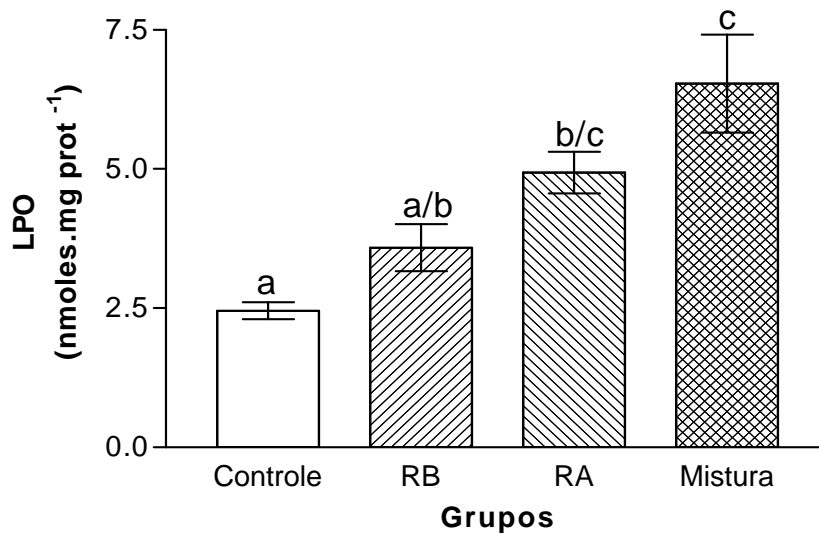


FIGURA 12 – Lipoperoxidação em *Astyanax sp* expostos ao herbicida Roundup® e a mistura deste com o herbicida Hexaron WG®. Os resultados expressam média ± erro padrão (N=10). RB: Roundup® 0,003 mL.L⁻¹, RA: Roundup® 0,006 mL.L⁻¹, Mistura: roundup® 0,006 mg.L⁻¹ + Hexaron WG® 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (p < 0,05, utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

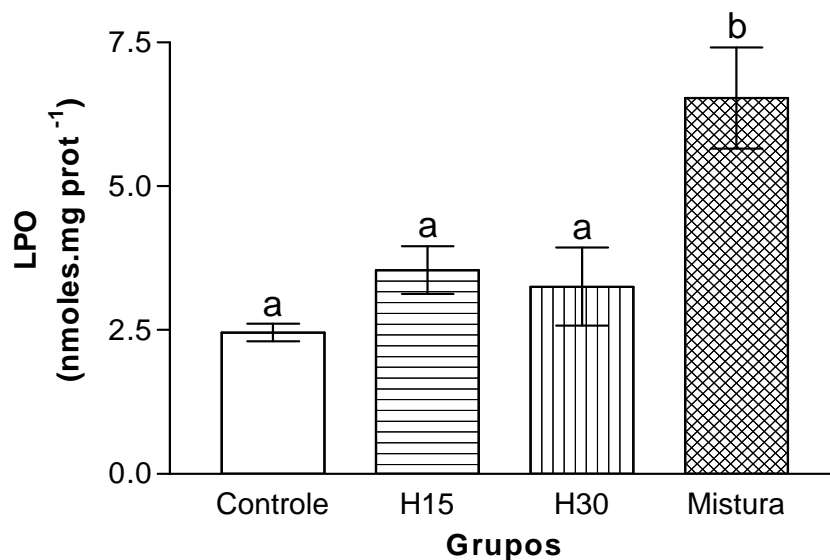


FIGURA 13 – Lipoperoxidação em *Astyanax sp* expostos ao herbicida Hexaron WG® e a mistura deste com o herbicida Roundup®. Os resultados expressam média ± erro padrão (N=10). H15: Hexaron WG® 15mg.L⁻¹, H30: Hexaron WG® 30mg.L⁻¹, Mistura: roundup® 0,006 mg.L⁻¹ + Hexaron WG® 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. (p < 0,05, utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

5.3.4 Atividade da AChE

No experimento com o Roundup[®] (média \pm erro padrão / RA: 313,8 \pm 21,27 / RB: 319,8 \pm 43,41) o grupo controle (246,1 \pm 10,59) não apresentou diferença dos grupos tratados com o herbicida de forma isolada, porém o grupo mistura (169,2 \pm 18,98; $p < 0,05$) teve uma diminuição na atividade da AChE em relação aos grupos RA e RB (Figura 14). Nos animais submetidos ao hexaron WG[®] o grupo H30 (372,9 \pm 40,36) teve atividade da AChE aumentada em relação ao controle (246,1 \pm 10,59) e ao grupo mistura (169,2 \pm 18,98), e o grupo mistura também diferiu quanto ao grupo H15, tendo atividade diminuída em relação ao mesmo (H15: 312,3 \pm 52,12; $p < 0,05$) (Figura 15).

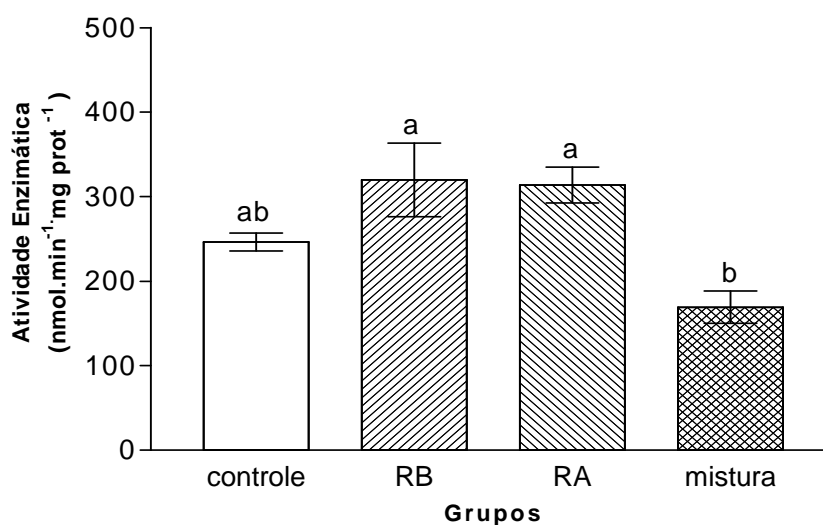


FIGURA 14 – Atividade específica da AChE em *Astyanax sp* expostos ao herbicida Roundup[®] e a mistura deste com o herbicida Hexaron WG[®]. Os resultados expressam média \pm erro padrão (N=10). RB: Roundup[®] 0,003 mL.L⁻¹, RA: Roundup[®] 0,006 mL.L⁻¹, Mistura: Roundup[®] 0,006 mg.L⁻¹ + hexaron WG[®] 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

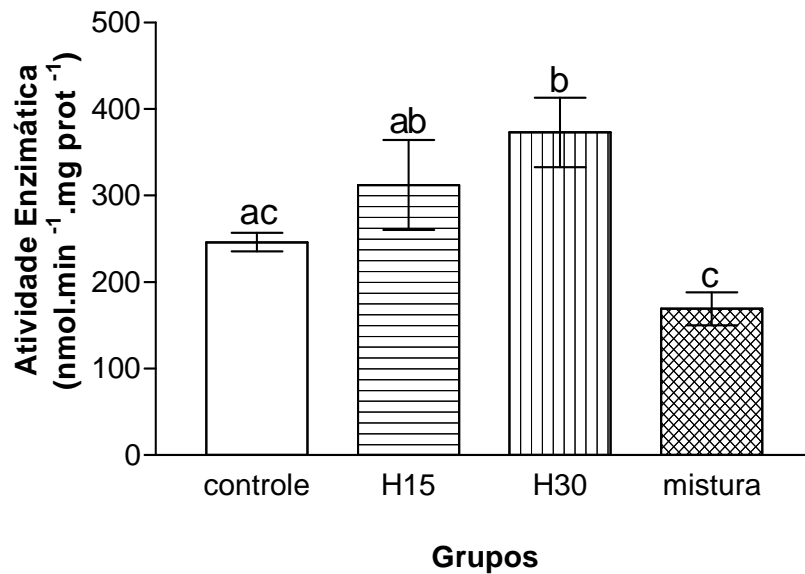


FIGURA 15 – Atividade específica da AChE em *Astyanax sp* expostos ao herbicida Hexaron WG[®] e a mistura deste com o herbicida Roundup[®]. Os resultados expressam média \pm erro padrão (N=10). H15: Hexaron WG[®] 15mg.L⁻¹, H30: Hexaron WG[®] 30mg.L⁻¹, Mistura: roundup[®] 0,006 mg.L⁻¹ + Hexaron WG[®] 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

5.3.5 Teste do Micronúcleo Písceo

O grupo exposto a mistura dos herbicidas apresentou maior número de alterações morfológicas nucleares e micronúcleos nos eritrócitos que o grupo controle (Figura 16 e 17). Quanto aos grupos tratados somente com o herbicida Roundup[®], ambos, RA e RB não apresentaram diferença quanto ao grupo controle, e no grupo RB foram encontradas menos alterações que no RA e que no mistura (Figura 16). Nenhuma diferença foi encontrada nos grupos tratados apenas com o herbicida hexaron WG[®] (Figura 17). A figura 18 exemplifica algumas alterações nucleares encontradas.

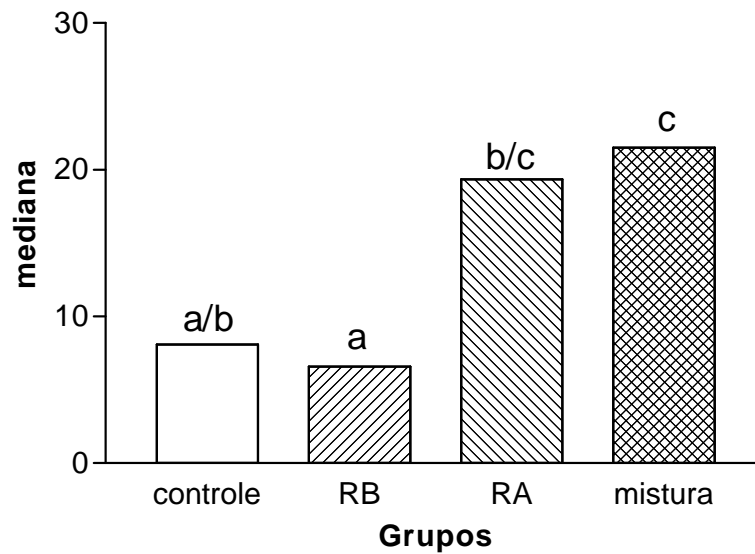


FIGURA 16 – Alterações Nucleares e micronúcleos em eritrócitos de *Astyanax* sp. expostos ao herbicida Roundup® e a mistura deste com o herbicida Hexaron WG®. RB: Roundup® 0,003 mL.L⁻¹, RA: Roundup® 0,006 mL.L⁻¹, Mistura: roundup® 0,006 mg.L⁻¹ + hexaron WG® 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, $n=12$).

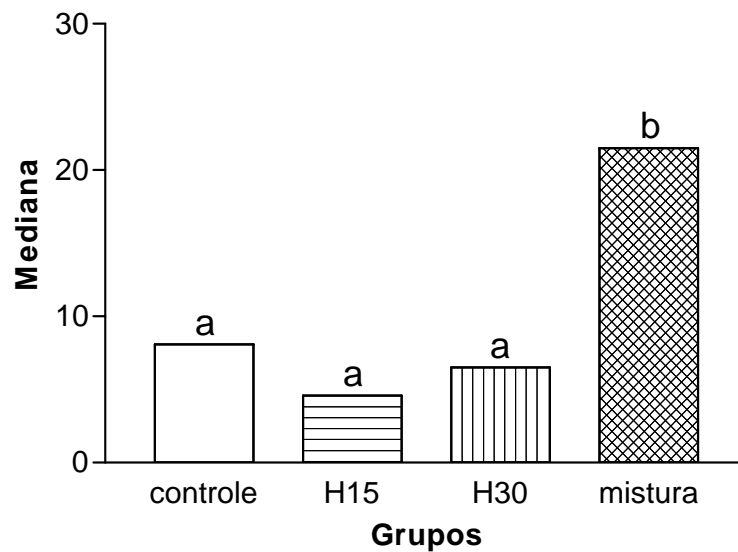


FIGURA 17 – Alterações Nucleares e micronúcleos em eritrócitos de *Astyanax* sp. expostos ao herbicida Hexaron WG® e a mistura deste com o herbicida Roundup®. H15: Hexaron WG® 15mg.L⁻¹, H30: Hexaron WG® 30mg.L⁻¹, Mistura: roundup® 0,006 mg.L⁻¹ + Hexaron WG® 30 mg.L⁻¹. OBS: letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais. ($p < 0,05$, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, $n=12$).

A Figura 18 exemplifica as principais alterações nucleares e micronúcleos encontradas no presente estudo.

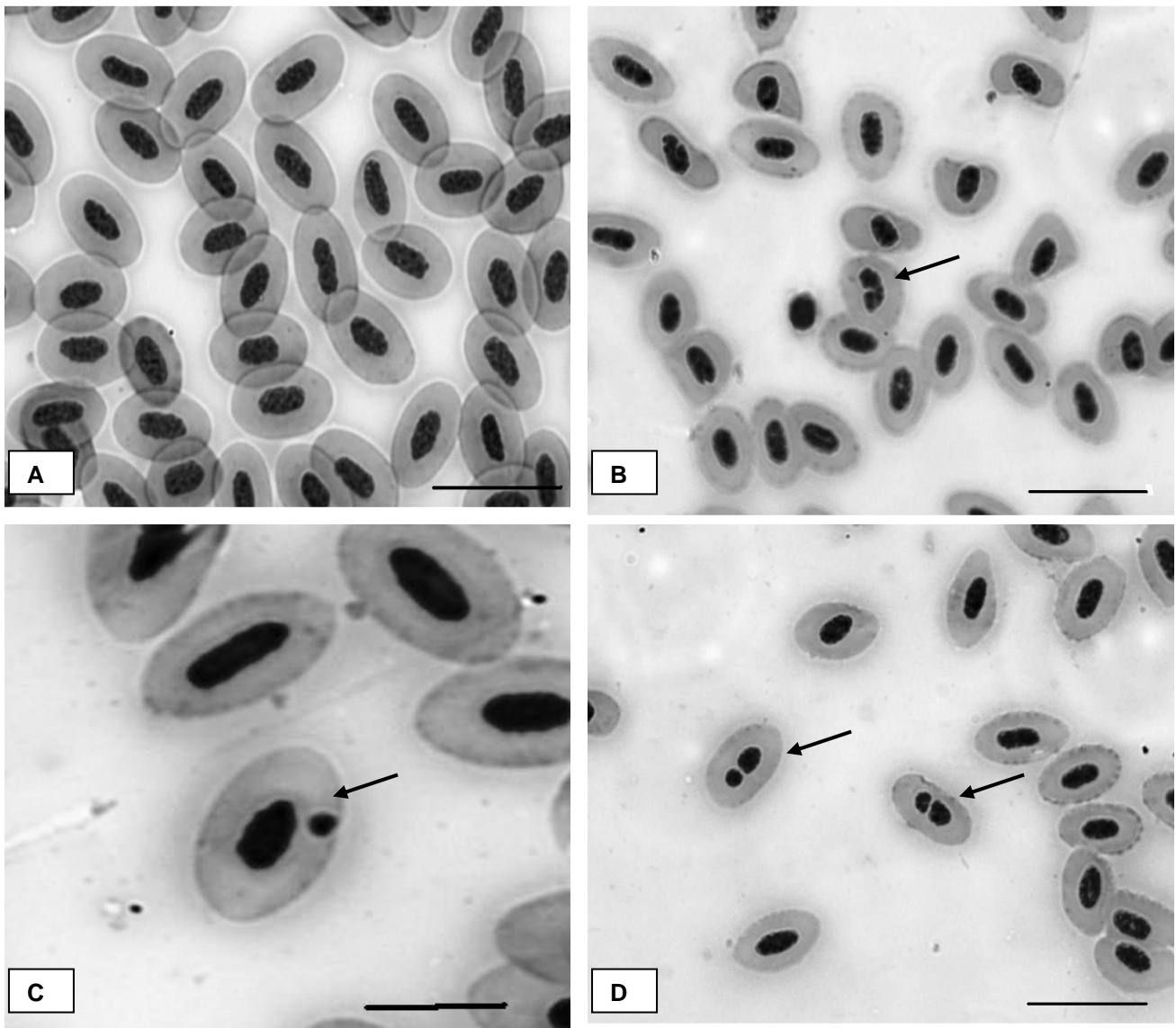


Figura 18 – Eritrócitos de *Astyanax* sp. dos diferentes grupos. Coloração em Giemsa 10%. A: estrutura normal dos núcleos dos eritrócitos (Barra = 20 μ m). B e D: setas indicam alterações nucleares (Barra em B e D = 20 μ m). C: seta aponta para um eritrócito com um micronúcleo (Barra = 10 μ m).

5.3.6 Histopatologia de Brânquias

Algumas lesões encontradas nas brânquias estão exemplificadas na Figura 19. Em todos os grupos foram encontradas as lesões analisadas, menos a bifurcação lamelar que não foi observada em nenhum indivíduo. Em alguns indivíduos foram observados aneurismas (Figura 19B), parasitos (Figura 19D) e hiperplasia do epitélio branquial algumas vezes acompanhada de fusão das lamelas secundárias adjacentes. Na grande maioria dos indivíduos foi observada a presença de descolamento epitelial (Figura 19C). Apesar da análise destes parâmetros ter sido apenas descritiva, verificamos que a distribuição das diferentes lesões foi regular em todos os grupos.

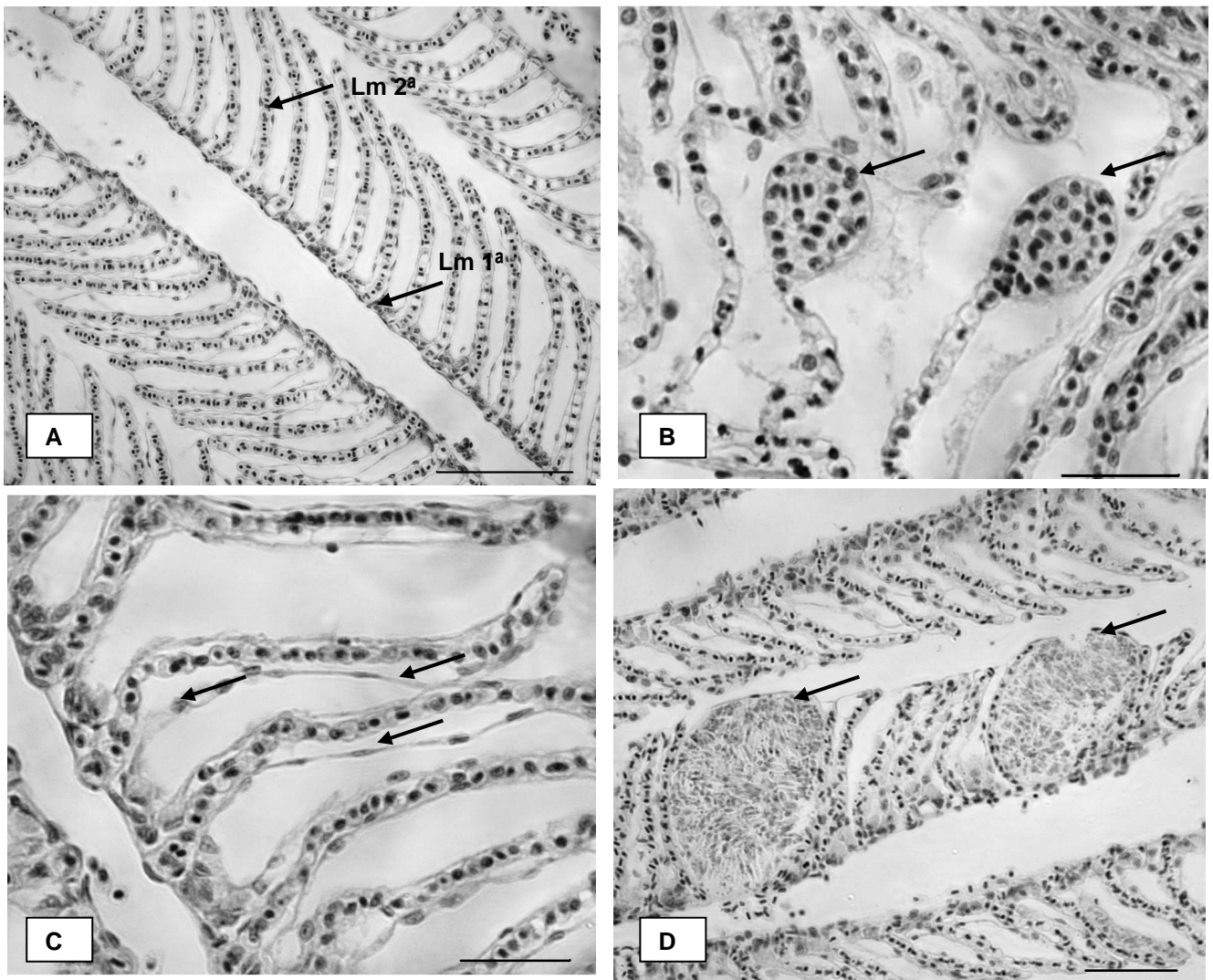


Figura 19 – Coretes histológicas do segundo arco branquial de *Astyanax* sp. dos diferentes grupos. Coloração em Hematoxilina e Eosina (HE). A: estrutura normal das lamelas; LM 1ª: lamela primária; LM 2ª: lamela secundária (Barra = 100µm). B: setas indicam alteração do tipo aneurismas (Barra = 30µm). C: setas indicam alterações do tipo descolamento de epitélio (Barra = 30µm). D: setas indicam presença de parasitas (Barra = 50 µm).

6 DISCUSSÃO

O uso de parâmetros biológicos para medir a qualidade da água se baseia nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem. O ambiente aquático está sujeito a inúmeras perturbações e a biota reage a esses estímulos, sejam eles naturais ou antropogênicos. A habilidade de proteger os ecossistemas depende da capacidade de distinguir os efeitos das ações humanas das variações naturais, buscando categorizar a influência das ações humanas sobre os sistemas biológicos (CAIRNS; McCORMICK; NIEDERLEHNER, 1993). De acordo com Fanta *et al.* (2003), com esta finalidade, testes laboratoriais utilizando doses subletais de poluentes têm sido recomendados por indicarem as primeiras conseqüências da exposição a um dado contaminante ou mistura de contaminantes.

A análise da concentração subletal do Roundup® para o nosso modelo de estudo *Astyanax sp* foi necessária, pois tal dado não foi encontrado na literatura. Nossos resultados mostram que a concentração $0,006\text{ml.L}^{-1}$ de roundup® ($0,002136\text{g.L}^{-1}$ de glifosato) é subletal para a espécie *Astyanax sp*, pois não matou nenhum indivíduo, enquanto as outras concentrações testadas alcançaram 100% de letalidade. Morgan e Kiceniuk (1992) encontraram uma CL_{50} para a truta arco-íris de $10,42\text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato na formulação Vision (similar ao Roundup®), equivalente a $0,029\text{ml.L}^{-1}$ de Vision. Outros autores como Folmar, Sanders e Junin (1979) e Hildebrand, Sullivan e Sullivan (1982) encontraram também para a truta arco-íris a concentração de $8,3\text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato na formulação Roundup®.

Da mesma forma para o Hexaron WG®, a concentração 30mg.L^{-1} , equivalente a $14,04\text{ mg.L}^{-1}$ de diuron mais $3,96\text{ mg.L}^{-1}$ de hexazinona, se mostrou subletal para a espécie *Astyanax sp*, pois esta não matou nenhum indivíduo. Segundo dados da ficha de informações deste produto, ele é tóxico para peixes e possui CL_{50} (96h) de $66,77\text{ mg.L}^{-1}$ para a espécie *Danio rerio*. Como praticamente não existem dados na literatura sobre os efeitos tóxicos desta formulação, usaremos os dados das substâncias ativas do mesmo para discutir nossos resultados.

Okamura (2001) encontrou uma concentração subletal de Diuron para a truta arco-íris de 74 mg.L^{-1} . Nebeker e Schuytema (1998) estudaram o efeito crônico do

diuron em peixes e invertebrados e constataram que a sobrevivência e reprodução do microcrustáceo *Daphnia pulex* foi reduzida significativamente quando a concentração de diuron na água era de $7,7 \text{ mg.L}^{-1}$. Quanto ao herbicida hexazinona, apenas um dado foi encontrado na literatura, Nieves-Puigdoller, Björnsson e McCormick (2007) relataram que a concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de hexazinona não causou mortalidade para salmons do Atlântico.

Os resultados encontrados para as concentrações subletais evidenciam as diferenças interespecíficas de sensibilidade aos xenobiontes, enfatizando a necessidade de se realizar experimentos com o maior número possível de espécies. E mostram ainda que a concentração subletal de um pesticida isolado pode ser diferente daquela encontrada para uma formulação onde existam pesticidas associados e substâncias inertes.

A avaliação da exposição, associada aos conhecimentos relativos aos efeitos na saúde, permite estabelecer as prioridades e as formas de intervenção efetivas para proteger uma população dos riscos químicos. Desta forma os estudos dos efeitos das substâncias químicas sobre a saúde possibilita avaliar o risco da população exposta e constitui o primeiro passo na fixação de normas ambientais para um contaminante químico presente num meio (AMORIM, 2003).

Uma das vantagens de se utilizarem os biomarcadores em níveis baixos de organização biológica é a possibilidade de detectar precocemente efeitos deletérios de poluentes, antes de serem evidenciadas alterações em níveis de organização biológica superiores. Estudos a nível populacional e de comunidade também fornecem informações sobre as mudanças ocorrentes, porém estas somente serão detectadas uma vez que a comunidade já foi impactada (MILÊNIO-CEM, 2005).

Os biomarcadores bioquímicos mais amplamente utilizados em programas de monitoramento ambiental são as enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos e seus metabólitos (enzimas de biotransformação e enzimas antioxidantes). Nos peixes, o fígado é o órgão mais comumente envolvido na destoxificação de xenobióticos, e a atividade destas enzimas pode ser induzida ou inibida (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2002). No presente estudo, o grupo hexaron WG[®] 30 mg.L^{-1} foi o único que apresentou atividade específica induzida de GST. Químicos ambientais que são eliminados via glutathionização

incluem compostos carcinogênicos, pesticidas, e intermediários reativos. A indução observada da enzima GST sugere um aumento do metabolismo causado por este xenobionte, na tentativa de eliminá-lo do organismo. Vários estudos relatam que a atividade da GST pode ser significativamente aumentada. Boon *et al.* (1992) encontraram indução da GST para a espécie *Pleuronectes platessa* quando esta foi exposta ao PCB Clofen A40. Chen *et al.* (1998) encontraram o mesmo para as espécies *Crucian carp* e *Carassius auratus* expostas a dioxinas e metais pesados. Em nossos resultados a enzima GST não sofreu alterações nos peixes expostos ao Roundup[®], da mesma forma Osten *et al.* (2005) também não encontraram indução desta em peixes mosquito (*Gambusia yucatana*) expostos a glifosato em formulação comercial similar ao Roundup[®].

Situações em que o metabolismo está aumentado, principalmente por exposição a xenobiontes, podem causar aumento nos níveis de espécies reativas podendo levar ao estresse oxidativo, como consequência, em situações normais seria esperado que os sistemas antioxidantes fossem mais ativados. O aumento da atividade específica da CAT tem sido relatado como indicador de estresse oxidativo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2002). Este aumento sugere uma defesa do organismo na tentativa de eliminar espécies reativas de oxigênio. O aumento na atividade hepática da catalase foi verificado em experimentos com bifenis policlorados (PCBs) e sedimentos contendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH). Gabryelak e Klekot (1985) observaram um aumento transitório na atividade eritrocitária da catalase em carpas expostas a paraquat. Porém tal enzima também pode ter sua atividade diminuída, como encontrado por Regoli, Nigro e Orlando (1998) em glândulas digestivas do molusco bivalvo (*Adamussium colbecki*) expostos ao cobre e ao mercúrio. A diminuição da atividade da catalase em hepatócitos de traíras (*Hoplias malabaricus*), expostos a metilmercúrio (MeHg), foi discutida por Filipak (2007) como sendo resultado da inibição da captação de metais essenciais como cálcio, ferro, cobre, e zinco, uma vez que a CAT é uma heme proteína e portanto necessita de ferro para sua síntese. O mesmo pode ter ocorrido no grupo tratado com o herbicida hexaron WG[®] na dose 30 mg.L⁻¹, já que este também apresentou atividade específica diminuída. Outros estudos também encontraram inibição desta enzima por metais pesados (Cd, Cr e Zn) e SO₂ (CHAOUÏ *et al.*, 1997;

TEISSEIRE; VERNET, 2000). Porém são necessários mais experimentos para elucidar tais mecanismos de ação.

O grupo que apresentou atividade específica significativamente induzida de GST (hexaron WG[®] 30 mg.L⁻¹) foi o único que apresentou também atividade da catalase diminuída e estes resultados corroboram os encontrados por Teisseire e Vernet (2000), que também encontram indução da GST e diminuição da atividade da CAT, em *Lemma minor* expostas a 0,25 mg.L⁻¹ de diuron. Não foram encontrados experimentos utilizando estes biomarcadores em organismos expostos ao herbicida hexazinona, também presente na formulação Hexaron WG[®].

Quando ocorre o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e sua eliminação através dos sistemas antioxidantes, é estabelecido o que chamamos de estresse oxidativo, condição esta em que o ambiente celular torna-se mais oxidante podendo causar danos nas diferentes biomoléculas como o DNA, podendo levar à formação de micronúcleos, oxidação de proteínas e lipídios de membranas. Segundo Livingstone (2001) o dano oxidativo pode ser o principal mecanismo da toxicidade de poluentes.

A integridade física das membranas biológicas é um pré-requisito indispensável para a regulação de muitos processos celulares. A alteração de importantes parâmetros celulares como a fluidez, a permeabilidade, o potencial elétrico e o transporte controlado através da membrana, são comuns danos devido à peroxidação lipídica (FILIPAK NETO, 2007). Vários estudos têm demonstrado aumento nos níveis de peroxidação lipídica em vários tecidos de peixes expostos a xenobiontes, como carpas expostas a paraquat (GABRYELAK; KLEKOT, 1985), *channel catfish (Ictalurus punctatus)* e *brown bulhead (Ameiurus nebulosus)* expostos a t-butil hidroperóxido (PLOCH *et al.*, 1999), robalos (*Dicentrarchus labrax*) expostos a metais pesados (ROMEO *et al.*, 2000). No presente estudo os animais expostos à mistura dos herbicidas apresentaram maior concentração de hidroperóxidos que os animais expostos aos herbicidas de forma isolada e animais controles. Com isso podemos supor que estes herbicidas atuando de forma conjunta causam mais danos às membranas do que quando isolados, o que nos chama a atenção para um possível efeito potenciador entre estas substâncias. Quanto aos

grupos expostos aos herbicidas isoladamente, apenas no grupo Roundup® 0,006 ml.L⁻¹ a LPO foi maior que no controle.

Os efeitos de substâncias genotóxicas sobre o genoma de peixes têm sido objeto de muitos estudos, sobretudo daqueles que buscam estabelecer a resposta dos genes aos estímulos ambientais (BÜCKER; CARVALHO; ALVE-GOMES, 2006).

A fragmentação do DNA sob condições em que há aumento da produção de espécies reativas pode ocorrer por dois mecanismos: Primeiro, radicais livres lipídicos produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (tanto na membrana plasmática quanto nuclear) podem diretamente atacar o DNA presente na cromatina do núcleo e/ou, segundo, a lipoperoxidação em uma célula causa a perda da integridade da membrana celular e pode tornar o ambiente favorável ao ataque ao DNA por outros tipos de radicais de oxigênio (HIGUCHI, 2003). Entretanto, nem todos os compostos que induzem a formação de micronúcleos são clastogênicos, ou seja, causam quebras no DNA. Heddle *et al.* (1973), afirmam que essas alterações nucleares podem ser resultantes de uma não disjunção do fuso a partir de chamados “contaminantes do fuso”.

A formação de micronúcleos pode se dar pela exposição aguda a uma substância genotóxica, sendo que a sua magnitude depende principalmente da sua intensidade, e provavelmente independe da duração da mesma (HEDDLE *et al.*, 1991).

Em estudos realizados na bacia Amazônica, o teste do micronúcleo foi utilizado para avaliação mutagênica de altas concentrações de mercúrio em três espécies comercialmente importantes da região (*Prochilodus nigricans* – Curimatã, *Mylossoma duriventris* - Pacu branco, e *Hoplias malabaricus* - Traíra), para todas estas foi encontrada ação genotóxica significativa quando comparado ao controle negativo (área não poluída), mostrando-se uma sensível metodologia para a detecção dos efeitos tóxicos deste contaminante (PORTO; ARAÚJO; FELDBERG, 2005). De acordo com Grisolia (2002), tilápias (*Tilapia rendalli*) submetidas a diferentes concentrações de glifosato na formulação comercial Roundup®, apresentaram aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos.

Quanto aos resultados deste estudo, apenas o grupo mistura apresentou maior frequência de micronúcleos em relação ao controle. O que concorda com os

dados da LPO, pois o mesmo foi observado entre o grupo mistura e o controle, e como descrito anteriormente a perda da integridade das membranas pode favorecer o ataque do DNA.

O sistema respiratório é a mais extensa interface de um peixe com a água, sendo freqüentemente o primeiro sistema a ser afetado por poluentes dissolvidos (HEATH, 1995). Pelo fato das brânquias terem importante função no sistema respiratório, no controle ácido-base, excreção e osmorregulação (ALLEN; YOKE; KEON, 1988), elas são consideradas indicadores eficientes da qualidade da água (RONCERO *et al.*, 1990; KIRK; LEWIS, 1993).

Segundo Ostrenski *et al.* (2001) os danos branquiais como proliferação tecidual, fusões lamelares e descolamento do epitélio branquial revelaram forte correlação com contaminação aguda. Alterações do tipo aneurismas podem estar associadas ao estresse causado durante o sacrifício.

Bhavan e Geraldine (1997) encontraram diversas alterações estruturais nas brânquias de *Macrobrachium malcolmsonii*, expostos ao endossulfano, dentre estas alterações estão a hiperplasia do epitélio branquial, a fusão de lamelas, e descolamento de epitélio. Lesões similares também foram encontradas no mesmo crustáceo, quando expostos a metais pesados (GHATE ; MULHERKAR, 1979). Vários autores relatam alterações branquiais como aneurismas, desorganização das lamelas secundárias, fusão lamelar, descolamento de epitélio e hiperplasias em peixes expostos ao petróleo ou seus derivados (SPIES *et al.*, 1996; AKAISHI *et al.*, 2004; NERO *et al.*, 2006; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). Estes tipos de alterações também já foram associadas a exposição de várias espécies de peixes expostos a inseticidas (ROY; MUNSHI, 1991; NOWAK e BARBARA, 1992).

Mallat (1985), sugere que as modificações observadas nas brânquias são muito pouco específicas, podendo ser simplesmente um reflexo de adaptações fisiológicas a um dado tipo de estresse.

Como em nosso experimento os diferentes grupos apresentaram de forma regular as lesões analisadas, algumas hipóteses podem ser lançadas: primeiro, que as concentrações utilizadas não foram suficientes para causar modificações estruturais neste órgão; segundo, o tempo de exposição aos contaminantes, nestas concentrações, não foi suficiente para causar modificações estruturais nas

brânquias; e terceiro, houve dano, mas este foi seguido de reparo antes mesmo do término do experimento. Neste caso o tempo de exposição para estas substâncias nestas concentrações parece que não foi suficiente para acarretar lesões de forma a comprometer a estrutura e o funcionamento das brânquias.

Atividades neurológicas e comportamentais de animais podem ser extremamente sensíveis a contaminação ambiental (BRETAUD; TOUTANT; SAGLIO; TRIJASSE, 2000). A medida da atividade da enzima AChE é rotineiramente utilizada como biomarcador de exposição a certos grupos de contaminantes como inseticidas organofosforados e carbamatos, porém outros compostos também podem atuar sobre a atividade desta enzima. Baixas concentrações destes componentes pode inibir a AChE, o que leva a um acúmulo de acetilcolina (ACh) em sinápses colinérgicas centrais e junções neuromusculares de vertebrados. Como consequência a locomoção e o equilíbrio dos organismos expostos podem ser afetados (BRETAUD; TOUTANT; SAGLIO, 2000). Saglio e Trijasse (1998) observaram alterações no comportamento de natação em peixes expostos ao diuron. Em tilápias (*Sarotherodon mossambicus*) expostas durante 60 dias a $0,55\text{g.L}^{-1}$ de diuron, Reddy *et al.* (1992) observaram natação descoordenada, movimentos operculares lentos e redução da locomoção. No presente estudo também foram observados tais sintomas, e a intensidade destes foi maior na dose 30 mg.L^{-1} de Hexaron WG[®]. Estes distúrbios comportamentais são similares aos sintomas causados pela inibição da atividade da AChE, uma vez que isto acarretaria em um aumento da concentração de ACh na fenda sináptica, e a estimulação continuada dos receptores acabaria por dessensibilizá-los, diminuindo assim a atividade colinérgica.

Experimentos realizados por Bretaudo, Toutant e Saglio (2000) mostraram que a concentração de 5mg.L^{-1} de diuron causou de 9 a 12% de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro de peixes Goldfish (*Carassius auratus*) quando expostos por 6, 12, 24 e 48 h, e o mesmo estudo não observou diminuição na atividade desta no tecido muscular. Em nosso trabalho a atividade colinesterásica do cérebro não foi mensurada, e a atividade no músculo sofreu um aumento significativo na concentração de 30 mg.L^{-1} de hexaron WG[®]. O mesmo grupo que sofreu este aumento também foi o que apresentou maior intensidade dos sintomas

motores, o que seria de se esperar uma vez que esta enzima é responsável pela inativação da acetilcolina na fenda sináptica, e conseqüente extinção do estímulo, levando da mesma forma a uma diminuição do sistema colinérgico. Porém o aumento da atividade desta enzima não pôde ser explicado através deste experimento. Não foram encontrados estudos correlacionando a exposição ao herbicida hexazinona com este biomarcador.

Embora Gluszczak *et al.* (2005) tenham encontrado diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro para *Leporinus obtusidens* submetidos a diferentes concentrações de Roundup[®], nossos resultados mostram que esta enzima não foi inibida nas concentrações estudadas no músculo de *Astyanax sp.* Porém quando este herbicida foi misturado com o Hexaron WG[®] uma significativa diminuição da atividade em relação aos grupos submetidos aos herbicidas de forma isolada foi observada. O fato de esta diminuição só ter aparecido no grupo mistura mostra mais uma vez um possível efeito potenciador entre estas substâncias. No entanto esta diferença não foi significativa em relação ao grupo controle.

7 CONCLUSÕES

- O herbicida Roundup® se mostrou pouco tóxico, nas concentrações testadas, para a espécie *Astyanax sp.* quando isolado. Apresentou alterações somente na maior concentração testada, nos biomarcadores LPO e frequência de micronúcleos, sendo que a esta só foi maior no grupo RA quando comparado com o RB.
- O herbicida Hezaron WG® também causou toxicidade somente na maior concentração testada, alterando os biomarcadores GST, CAT e AChE.
- A mistura de ambos os pesticidas teve um padrão de alterações semelhante ao do herbicida Roundup® quando isolado, pois também aumentou a LPO e a frequência de micronúcleos.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Academic Press**, v. 105, p.121-126, 1984.

AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; STJEAN, S.; COUTERNAY, S. C.; LIMA, E.; WAGNER, A. L. R.; SCOFIELD, A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 46, p. 244–253, 2004.

ALLEN, P.; YOKE, S.; KEONG, W.M. Acute effects of mercury chloride on intracellular CSH level and mercury distribution in the fish *Oreochromis aureus*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**. v. 40, p.178-184, 1988.

AL-SABTI, R. Chromosome damage in fish as a pollution monitor of aquatic environments. **Handbook of Genotoxic, effects and fish chromosomes**. p. 5 – 39. 1991.

AMORIM, L. C. A. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. **Revista brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v. 6, n. 2, 2003.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: relatório anual 2004. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 22 abril, 2006.

ANVISA. Agrotóxicos e Toxicologia: Monografia de produtos agrotóxicos. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 25 abril, 2006.

ARMAS, E. D. de; MONTEIRO, R. T. R.; AMANCIO, A. V. The use of pesticides in sugar cane at the Corumbataí river basin and the risk of water pollution. **Química Nova**. v.28, n.6, p.975-982, 2005.

BARBOSA, F. A. R. Workshop: Brazilian Programme on Conservation and Management of Inland Waters. **Acta Limnologica Brasiliensia**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas/Sociedade Brasileira de Limnologia. v. 5, 1994.

BHAVAN, P.S., GERALDINE, P. Alterations in concentrations of protein, carbohydrate, glycogen, free sugar and lipid in the prawn *Macrobrachium*

malcolmsonii on exposure to sublethal concentrations of endosulfan. **Pesticides Biochemistry and Physiology**. v.58, p.89–101, 1997

BOON, J.P., EVERAARTS, J.M., HILLEBRAND, M.T.J., EGGENS, M.L., PIJNENBURG, J., GOKSOYR, A. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). **Science of the Total Environment**. v.114, p.113-133, 1992.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRETAUD, S.; TOUTANT J.; SAGLIO P. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 47, p. 117-124, 2000.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios **Cadernos de Saúde Pública**. v.19, n.2, 2003.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazônica**. v. 36(3), p. 357 – 364, 2006.

CAIRNS Jr., J.; McCORMICK, P. V. & NIEDERLEHNER, B. R. A proposal framework for developing indicators of ecosystem health. **Hydrobiologia**, v.263, p.1-44. 1993.

(CEM-UFPR) PROJETO MILÊNIO: Seção 3 - Biomarcadores. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em: < <http://www.cem.ufpr.br/ftp/milenio>> Acesso em: 01 julho, 2006.

CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; HABIB G. M.; FERJANI E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.), **Plant Science**. p.127-139, 1997.

CHEN, G., XU, Y., XU, L., ZHENG, Y., SCHRAMM, K.W., KETTRUP, A. Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v. 40, p.234-238, 1998.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE nº357. **Citação e referências a documentos eletrônicos.** Disponível em: <www.dcm.puc-rio.br/download/Conama357.pdf> Acesso em: 15 junho, 2007.

CUT (Central Única dos Trabalhadores). Meio ambiente, saúde e trabalho. **Citação e referências a documentos eletrônicos.** Disponível em: < www.sindipetro.org.br> Acesso em: 21 abril, 2006.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação de ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, no. 1, p. 27-36, 2001.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v.7, p. 88-96, 1961.

EMBRAPA. Relações agricultura e meio ambiente. **Citação e referências a documentos eletrônicos.** Disponível em < www.cnpma.embrapa.br/informativo/index.php3#149 > Acesso em: 22 abril, 2006.

FANTA, E.; RIOS, F. S. A.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.54, p.119 – 130, 2003.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. v.26, n.1, p.3 -10, 1996.

FILIPAK NETO, F. **Avaliação citotóxica em hepatócitos de *Holipias malbaricus* expostos a misturas complexas de pesticidas, MeHg e DDT.** Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná em 2007.

FIELD, J.A., REED, R.L., SAWYER, T.E., GRIFFITH, S.M., WIGINGTON, P.J. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. **Journal of Environmental Quality**. v.32, p.171–179, 2003.

FOLMAR, L.C.; SANDERS, H.O.; JULIN, A.M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Archives of environmental contamination and toxicology**. v. 8, p. 269-278, 1979.

GABRYELAK, T., KLEKOT, J. The effect of paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.81(2), p.415-418, 1985.

GHATE, H.V., MULHERKAR, L. Histological changes in the gills of two freshwater prawn species exposed to copper sulphate. **Indian Journal of Experimental Biology**. v.17, p.838-840, 1979.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, FONSECA, M.; M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, M. F. ; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.65, p. 237-241, 2005.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research** v.518, p. 145-150, 2002.

GUARATINI, T; MEDEIROS, M H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidants in the skin: applications and evaluation of their efficacy. **Química Nova**. v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

HAI, D.Q., VARGA, I.S., MATKOVICS, B. Effects of an organophosphate on the antioxidant systems of fish tissues. **Acta Biologica Hungarica**. v.46, p. 39- 50, 1995.

HANG,H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Farmacologia. 5ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. P. 159-161, 2004.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**. v. 18, p. 187-190, 1973.

HEATH, A. C. "Water Pollution and Fish Physiology", 2nd ed. Lewis, Boca Raton, 1995.

HIGASHI, K. **Relatório do XV Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas**, (São Paulo) 1991, 68.

HILDEBRAND, L. D.; SULLIVAN, D.S.; SULLIVAN T. P. Experimental studies of rainbow trout population exposed to field application of roundup herbicides. **Archives of environmental contamination and toxicology**. v.11, p.2038-2043, 1982.

HIGUCHI, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by

oxidative stress. **Biochemistry and Pharmacology**, v. 66, p. 1527-1535, 2003.

JIANG Z-Y.; HUNT J. V.; S. P. WOLFF. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**. v.202, p. 384-389, 1992.

JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>> Acesso em: 10 agosto, 2007.

JUNIOR, O. P. A.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Desenvolvimento de método simples para a determinação de diuron por cromatografia a líquido em amostras de laranja. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e meio ambiente**. v. 15 p.15-20, 2005.

KAPPUS, H. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. **Chemistry and Physics of Lipids** v.45, p.105- 115, 1987.

KIRK, R. S.; LEWIS, J.W. An evaluation of pollutant induced changes in the gills of rainbow trout using scanning electron microscopy. **Environmental Technology**. v.14, p. 577-585, 1993.

LIVINGSTONE. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, ed. 8, p. 656-666, 2001.

LOBÓN-CERVIÁ, J.; BENNEMANN, S. Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical, omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in rio Tibagi (Paraná, Southern Brazil). **Archives of Hydrobiology**. v. 149, n. 2, p. 285-306, 2000.

MALLATT, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other Irritants: A statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v.42, p.630-648, 1985.

MALATO, S., BLANCO, J., CACERES, J., FERNANDEZ-ALBA, A.R., AGUERA, A., RODRIGUEZ, A. Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-Fenton and TiO₂ using solar energy. **Catalysis Today**. v.76, p.209–220, 2002.

MONSANTO. Roundup. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <www.monsanto.com.br/roundup/roundup/roundup.asp> Acesso em: 06 junho, 2006.

MOREIRA, J. C., JACOB, S. C., PERES, F.; Lima, J. S.; Meyer, A.; Oliveira-Silva, J. J.; Sarcinelli, P. N.; Batista, D. F.¹ Eglar, M.; Faria, M. V. C.; Araújo, A.J.; Kubota, A. H.; Soares, M. O.; Alves, S. R.; Moura, C. M.; Curi, R. Integrated evaluation of the health impact of pesticide use in a community at Nova Friburgo, RJ. **Ciência e saúde coletiva**. v. 7, p. 299-311, 2002.

MORGAN, M. J.; KICENIUK, J.W. Responses of rainbow trout to a two month exposure to Vision, a glyphosate herbicide. **Environmental contamination and toxicology**. v.48, p.772-780, 1992.

MUSUMECI, M.P.; NAKAGAWA, L.E.; LUCHINI, L.C.; MATALLO, M.B.; ANDREA, M.M. Degradação do diuron-¹⁴C em solo e em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.775-778, 1995.

NEBEKER, A. V.; SCHUYTEMA, G.S. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater Cladocerans, Amphipods, Midges, Minnows, Worms and Snails. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.35, p.441-446, 1998.

NERO, V., FARWELL, A., LISTER, A., VAN DER KRAAK, G., LEE, L.E.J., VAN MEER, T., MACKINNON, M.D., DIXON, D.G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 63, p. 365-377, 2006.

NIEVES-PUIGDOLLER, K.; BJÖRNSSON, B. T.; MCCORMICKA, S. D. Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. **Aquatic Toxicology** . v. 84, p. 27–37, 2007.

NITSCHKE, L.; SCHÜSSLER, W. Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. **Chemosphere**, v.36, p.35-41, 1998.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gônadosomático de lambaris do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Revista Brasileira de Biologia**. v. 35 (4), p. 775-798, 1975.

NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. **Aquatic Toxicology**. v. 23, p. 65–83, 1992.

OKAMURA, H.; WATANABE, T.; AOYAMA, I.; HASOBE, M. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. **Chemosphere**. v. 46, p. 945–951, 2001.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., VOLLAIRE, Y., SANCHEZ-CHARDI, A., ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**. v. 74, p. 53–69, 2005.

OSTEN, J. R.; ORTÍZ-ARANA A.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A.M.V.M. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. **Chemosphere**. v. 58, ed 5, p. 627-636, 2005.

OSTRENSKI, A., CHAVES, P.T.C., DUBOC, L.F., GUIMARÃES, A.T.B., CRUZ, S.R.Z., WEGBECHER, F.X., PILCHOWSKI, R.W., TEIXEIRA, U.A., BELZ, C.E., 2001. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüí e Iguaçu. In: UN-REPAR/PETROBRÁS. **2º Seminário do Rio Iguaçu** . p. 32–52, 2001.

PASTRO, M. A. **Avaliação de risco do produto rodeo (princípio ativo glifosato) para o ambiente aquático**. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação mestrado, 1995.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin** v. 32, ed. 2, p. 225-231, 1996.

PETERSON, H.G., BOUTIN, C., FREEMARK, K.E. Toxicity of hexazinone and diquat to green algae, diatoms, cyanobacteria and duckweed. **Aquatic Toxicology**. V. 39, p. 111–134, 1997.

PLOCH, S.A., LEE, Y.-P., MACLEAN, E., DI GIULIO, R.T. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to tert -butyl hydroperoxide. **Aquatic Toxicology**. Vol. 46, 231- 240, 1999.

PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C.S.O.; FELDBERG, E. 2005. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**. Nº 97. p. 287-292.

REBELLO, J. M. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e anti-tumoral de chalconas sintéticas**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

REDDY, D. C., VIJAYAKUMARI, P., KALARANI, V.; DAVIES, R. W. Changes in Erythropoietic activity of *Sarotherodon mossambicus* exposed to sublethal concentrations of the herbicide diuron. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 49, p. 730-737, 1992.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. **Aquatic Toxicology**. v.40, p.375-392, 1998.

RIBEIRO, L. R. . Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores "in vivo". In: Lucia Regina Ribeiro e Edmundo Kanan Marques. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. 1a. ed. Canoas-RS: Editora da ULBRA. p. 173 – 176, 2003.

ROMEO, M., BENNANI, N., GNASSIA-BARELLI, M., LAFURIE, M., GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**. v. 48, p. 185- 194, 2000.

RONCERO, V.; VICENTE, J. A.; REDONDO, E.; GAZQUEZ, A.; DURAN, E. Experimental lead nitrate poisoning: Microscopic and ultrastructural study of the gills of tench (*Tinca tinca*, L.). **Environmental Health Perspectives**. v. 89, p. 137-144, 1990.

ROY, P.K., MUNSHI, S. Malathion induced structural and morphometric changes of gills of a freshwater major carp *Cirrhinus mrigala* (Ham). **Journal of Environmental Biology**. v. 12, p. 79–87, 1991.

SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioural responses to atrazine and diuron in goldfish. **Archives of environmental contamination and toxicology**. v. 35, p. 484-491, 1998.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W. e TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. v. 6, p.75-86, 1997.

SCHMALZ, W.F., HERNANDEZ, A.D., WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Marine Environmental Research**. v. 54, p. 539–542, 2002.

SILVA DE ASSIS, H.C. **Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**. Julho 1998, Tese (doutorado) Universidade Técnica de Berlim, Alemanha.

SILVA, M. D. **Biomonitoramento de uma reserva particular do patrimônio natural – RPPN – através do estudo de biomarcadores em *Astyanax sp.***

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2004.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola): Defensivo Agrícola: O que é? **Citação e referências a documentos eletrônicos.** Disponível em < www.sindag.com.br> Acesso em: 25 abril, 2006.

SMITH, E. A.; OEHME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Veterinary Human Toxicology**, v. 34, n. 6, p. 531-543, 1992.

SOUZA, M. D.; BOEIRA, R. C.; GOMES, M. A. F. Adsorção e dessorção de diuron em solos tropicais. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 10, p. 113-124, 2000.

SPIES, R.B., STEGEMAN, J.J., HINTON, D.E., WOODIN, B., SMOLOWITZ, R., OKIHIRO, M., SHEA, D. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara channel. **Aquatic Toxicology**. v. 34, p. 195–219, 1996.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. **Environmental Research**. p. 235-335, 1992.

STURM, A., WOGRAM, J., SEGNER, H., LIESS, M. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.19, p.1607- 1615, 2000.

TEISSEIRE, H.; VERNET, G. Is the “Diuron Effect” Due to a Herbicide Strengthening of Antioxidative Defenses of *Lemna minor*? **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 66, p. 153–160, 2000.

TEW, K. D.; RONAI, ZE'EV. GST function in drug and stress response. **Drug Resistance Updates**. v. 2, p.143–147, 1999.

THURMAN, E.M., BASTIAN, K.C., MOLLHAGEN, T. Occurrence of cotton herbicides and insecticides in playa lakes of the high Plains of West Texas. **Science of the Total Environment**. v. 248, p.189 – 200, 2000.

TOMITA, R. Y. Toxicologia em ambientes aquáticos. **O Biológico**. v.64, n.2, p.135-142, 2002.

TORRES, M. C. L. SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, no. 2 , 2004.

VANCINI, R. L.; LIRA, C. A. B.; ABOULAFIA, B.; NOUAILHETAS, V. L. A. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. 2005. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <www.centrodeestudos.org.br/pdfs/oxidativo.pdf> Acesso em: 27 fev. 2007.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13, p. 57-149, 2002.

WALKER, C.H.; THOMPSON, H.M., 1991. Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. In: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase-inhibiting Insecticides, **Chemicals in Agriculture**, vol. 2. Elsevier, Amsterdam, pp. 1_ 17.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis. Londres, 321p., 1996.

WANG, X.; WANG, C.; TAN, C. Degradation and metabolism of hexazinone by two isolated bacterial strains from soil. **Chemosphere**. v. 61, p. 1468–147, 2005.

WESTER, P. W e CANTON, J. H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**: v.100, p.115-117, 1991.

WINSTON, G.W., DI GIULIO, R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**. v.19, p. 137- 161, 1991.

WHO (World Health Organization). Environmental health criteria. 1994, nº159. Glyphosate. **Citação e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm> > Acesso em: 27 fev. 2007.

ZHONGLIN, Z., ZHENGJUN, S., DAOJI, C. Evaluation on effect of hexazinone on eco-environment. **Advanced Environmental Science**. v.6, p. 11–20, 1998.