

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

Thaís Maylin Sobjak

**ATIVIDADE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE E EFEITOS NEUROTÓXICOS
EM LARVAS DE *Rhamdia quelen* EM EXPOSIÇÃO AGUDA AO GLIFOSATO**

CASCADEL

2016

THAÍS MAYLIN SOBJAK

**ATIVIDADE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE E EFEITOS NEUROTÓXICOS
EM LARVAS DE *Rhamdia quelen* EM EXPOSIÇÃO AGUDA AO GLIFOSATO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Orientadora: Ana Tereza Bittencourt Guimarães
Coorientadora: Silvia Romão

CASCABEL

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S659a

Sobjak, Thaís Maylin

Atividade do sistema antioxidante e efeitos neurotóxicos em larvas de *Rhmdia quelen* em exposição aguda ao glifosato ./Thaís Maylin Sobjak. Cascavel, 2016.

60 f.

Orientadora: Profª. Drª. Ana Tereza Bittencourt Guimarães

Coorientadora: Profª Drª. Sílvia Romão

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2016

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

1. Herbicida. 2. Organofosforado. 3. Jundiá. 4. Sazonalidade. 5. Larvicultura. I. Guimarães, Ana Tereza Bittencourt. II. Romão, Sílvia. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed. 597

632.954

CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

Agradecimentos

Todos que estão no meio acadêmico sabem que a conclusão de um curso, um mestrado ou um doutorado é considerada mais uma fase que se completa, mais uma etapa que concluímos, mais um degrau que subimos. Essas etapas nos transformam de diversas formas, nos amadurecendo, nos fazendo descobrir e entender coisas novas, mas nada disso é possível sem a contribuição de pessoas. Em algumas poucas palavras quero expressar meus agradecimentos a todos que participaram desta minha etapa “mestrado”.

Agradeço ao Único que foi capaz de me sustentar em meio aos desesperos, me lembrando que só Ele pode cuidar de mim de maneira assombrosamente maravilhosa, ao Único que me capacitou a completar mais esta etapa me mostrando quão admiráveis são todos os Seus feitos. Ao Deus desconhecido no Aerópago, mas revelado numa estrabaria.

Agradeço a minha orientadora, Ana Tereza, que me ensinou não apenas o que eu precisava saber para concluir esta fase, mas também me aceitou com as minhas diferenças, me levou a superar minhas dificuldades e limitações sem humilhações e inúteis frustrações, me ensinou a refletir sobre as diversas situações e respeitar os outros como seres humanos.

A mesma gratidão eu sinto pela minha Coorientadora Silvia, sempre disposta a nos ensinar, independente do horário ou do desespero que eu demonstrasse. Obrigada pela paciência e pelo esforço empregado no meu desenvolvimento.

À CAPES pela bolsa de estudos fornecida para realização deste trabalho.

Agradeço também a minha família por todo amparo e base sólida que me deram até aqui. Aos meus pais por todo apoio e sustento, em todas as formas. Ao meu irmão por todas as formatações e até pelas madrugadas me ajudando com os artigos.

Sou grata também a todos meus tios e primos que se preocuparam comigo e nos ajudaram nesta caminhada.

Aos amigos, que me ajudaram de alguma forma. Agradeço aqueles que me ouviram pacientemente e me mostraram um outro ângulo daquela situação. Aqueles que me distraíram nos momentos de tensão. Aqueles que me acolheram em suas casas. Aqueles que me ouviram chorar, enxugaram minhas lágrimas e contaram uma piada para que eu pudesse pensar em outra coisa. Aqueles que leram meus trabalhos, viram minhas apresentações, me criticaram e ajudaram a trabalhar a crescer. Aqueles que se tornaram como irmãos.

Vocês todos fizeram parte desta caminhada, Marília, Giuliana, Eliseu, Linda, Queli, Jardel, Andrey, Suellen, Rogério da Silva, Josivange, Dona Geni, Rogério de Oliveira, Idiani, Érika, Marisa e Carlos, Mafe (Maria Fernanda), Virgílio, Matheus, Rennan.

Agradeço também ao pessoal do laboratório de Patologia da UFFS de Laranjeiras do Sul-PR, por todo apoio, pelas horas de trabalho, pelo espaço concedido, especialmente a professora Luiza, por todo conhecimento e tempo ajudando nas análises, ao Cristian, que não mediu esforços para realizar o experimento e ao Lucas pelas análises bioquímicas.

Ao pessoal da bioquímica da Unioeste que me ajudou com todas as análises, especialmente ao Giovanne, a Letícia e a Carla.

Ao laboratório de Biologia Celular da Unioeste pelo espaço físico e todos os equipamentos.

Aos funcionários da Unioeste- Cascavel.

RESUMO

O avanço das técnicas agrícolas possibilitou melhoria e maior produtividade de alimentos, mas também fez com que o uso exacerbado e inadequado de agroquímicos promovesse efeitos agudos a espécies não-alvo. Os agrotóxicos são os agentes de maior potencial na degradação dos ambientes aquáticos, já que, por meio do deflúvio superficial de áreas agrícolas, escoam substâncias orgânicas ou inorgânicas, naturais ou sintéticas. Dentre os agrotóxicos mais utilizados atualmente pode-se citar o herbicida não-seletivo glifosato e compostos organofosforados. Para se compreender e prevenir os danos causados ao ambiente, pesquisadores têm utilizado múltiplos biomarcadores como uma ferramenta eficaz para avaliação de contaminação ambiental. O presente estudo foi dividido em dois estudos: um experimento manipulativo e outro natural. O primeiro estudo teve por objetivo investigar os efeitos neurotóxicos e sobre o sistema em larvas de *Rhamdia quelen* expostas a concentração subletal de glifosato. Neste estudo foi possível concluir que, apesar dos animais expostos ao glifosato terem maior porcentagem de sobrevivência, ocorreu uma indução precoce da atividade colinesterásica e do sistema antioxidante, seguido da dificuldade de manutenção das atividades do sistema antioxidante nos horários posteriores, resultando em uma maior lesão ao nível celular. O estresse que os animais sofreram ao serem expostos ao herbicida glifosato provoca uma alteração no seu metabolismo sendo característica de resistência elástica. No segundo estudo, o objetivo proposto foi avaliar alterações neurotóxicas e do sistema antioxidante em *R. branneri* presentes em riachos com diferentes níveis de contaminação ambiental nos períodos de outono e inverno. Nesta análise, a resposta dos biomarcadores está relacionada à variação temporal, e possivelmente à exposição desses animais à agrotóxicos. Com os resultados obtidos observou-se que, a biota local respondeu de forma diferente em cada estação, sinalizando que a fauna está em contato com agentes oxidantes e colinesterásicos no período de outono, quando há maior frequência de plantio e uso de agrotóxicos

Palavras-chave: herbicida; organofosforado; jundiá; sazonalidade; larvicultura

ANTIOXIDANT SYSTEM ACTIVITY and NEUROTOXIC EFFECTS in LARVAE of *Rhamdia quelen* in ACUTE EXPOSURE to GLYPHOSATE

ABSTRACT

The advancement of agricultural techniques has enabled improvement and greater productivity, but also made the use of agrochemicals and inadequate in promoting exaggerated acute effects to non-target species. The pesticides are agents of greatest potential in degradation of aquatic environments, since, through the flood of agricultural areas, flowing organic or inorganic substances, natural or synthetic. Among the pesticides most used currently, include the non-selective herbicide glyphosate and organophosphorus compounds. To understand and prevent the damage caused to the environment, researchers have used multiple biomarkers as an effective tool for evaluation of environmental contamination. This study was divided into two studies: a manipulative experiment and other natural. The first study aimed to investigate the neurotoxic effects and about the system in larvae of *Rhamdia quelen* exposed to sublethal concentration of glyphosate. In this study it was possible to conclude that, in spite of the animals exposed to glyphosate having highest percentage of survival, there was an early induction of cholinesterase activity and antioxidant system, followed by the difficulty of maintaining the activities of antioxidant system in later times, resulting in a greater injury at the cellular level. The stress that animals suffer when they are exposed to the herbicide glyphosate causes a change in your metabolism being characteristic of elastic resistance. In the second study, the objective was to evaluate changes in antioxidant system and neurotoxic *R. branneri* present in streams with different levels of environmental contamination during autumn and winter. In this analysis, the response of biomarkers is related to the temporal variation, and possibly the exposure of these animals to pesticides. With the results obtained showed that the local biota responded differently in each season, signaling that the fauna is in contact with oxidizing agents and cholinesterasic in the period of autumn, when there is increased frequency of planting and use of pesticides.

Keywords: herbicide; organophosphate; silver catfish; seasonality; larviculture

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Tabela 1- Atividade de biomarcadores em ovos/larvas de *Rhamdia quelen* não exposto (Controle) e expostos durante 72 horas a 6,5 mg/L de glifosato. Os resultados estão expressos em média \pm EPM para cada grupo em cada tempo de exposição.....23

Artigo II

Tabela 1- Análise de parâmetros físicos e químicos das águas dos riachos obtidos nas estações de Outono e Inverno.....47

Tabela 2- Análise de parâmetros físicos e químicos das águas dos riachos obtidos no Inverno.....47

Tabela 3- Análise da concentração de pesticidas nas amostras de sedimento dos riachos.....48

Tabela 4 - Médias e Desvios-Padrão das variáveis biométricas de *R. branneri*.....48

Tabela 5- Autovalores e variâncias acumuladas para cada eixo, e respectivas cargas fatoriais.....51

LISTA DE FIGURAS

Artigo I

Figura 1. Taxa de sobrevivência (%) de ovos/larvas de <i>Rhamdia quelen</i> nos grupos Controle e Tratado com 6,5 mg/L de glifosato.....	23
Figura 2. Atividade de biomarcadores em ovos/larvas de <i>Rhamdia quelen</i> expostos a 6,5 mg/L de glifosato (Tratamento) e animais acondicionados apenas em água (Controle), por diferentes tempos de experimentação (12, 24, 48 e 72 horas)..	25
Figura 3. Índice de Resposta de Biomarcadores Integrados (RBI).	26
Figura 4. Valores de RBI para os horários de exposição do grupo Tratado ao glifosato.	26
Figura 5. Modelo conceitual da atuação do glifosato sobre ovos/larvas de <i>Rhamdia quelen</i>	31

Artigo II

Figura 1. Mapa com indicação dos pontos de coleta.....	41
Figura 2. Percentual médio de área de plantio na região oeste do Paraná. SEAB, 2016.....	46
Figura 3. Box plots dos biomarcadores avaliados no rio Manoel Gomes, Arroio Pedregulho e Córrego Arquimedes.....	50
Figura 4. Diagrama de Ordenação das variáveis bióticas (biomarcadores) e abióticas (Vegetação e Pesticida) derivadas da análise de componentes principais.....	51
Figura 5. Médias e Desvios Padrão das cargas fatoriais do primeiro e segundo componente principal.....	52

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ANTIOXIDANT SYSTEM ACTIVITY and NEUROTOXIC EFFECTS in LARVAE of <i>Rhamdia quelen</i> in ACUTE EXPOSURE to GLYPHOSATE.....	vii
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
Capítulo I.....	15
Atividade do sistema antioxidante e efeitos neurotóxicos em larvas de <i>Rhamdia quelen</i> em exposição aguda ao glifosato	16
RESUMO	16
1. Introdução	17
2. Material e Métodos.....	18
3. Resultados.....	23
4. Discussão.....	27
5. Conclusão.....	32
Referências	32
Capítulo II	37
Avaliação do sistema antioxidante e neurotoxicidade em <i>Rhamdia branneri</i> (Teleostei: Heptapteridae) coletadas em riachos da bacia do baixo rio Iguaçu .	38
RESUMO	38
1. Introdução	39
2. Material e Métodos.....	40
3. Resultados.....	46
4. Discussão.....	52
5. Conclusão.....	56
Referências	57

INTRODUÇÃO GERAL

Este estudo teve como propósito realizar experimentos manipulativos e naturais com espécies de peixe do gênero *Rhamdia*, pertencentes a ordem Siluriforme, classe Actinopterygii e família Heptapteridae (BOCKMANN; GUAZZELLI, 2003). A espécie *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) apresenta distribuição desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (BALDISSEROTTO; RADUNZ NETO, 2004). Sua ampla distribuição, grande tolerância a baixas temperaturas, elevada taxa de reprodução e ganho rápido de peso durante os meses mais quentes do ano (GOMES et al., 2000) são os principais motivos para o seu interesse em piscicultura. Esta espécie apresenta importância econômica e o impulso da larvicultura deste peixe gerou um modelo para otimizar a produtividade de peixes em diversas regiões do Brasil (KREUTZ et al., 2010).

Outra espécie deste gênero é a *Rhamdia branneri* (HASEMAN, 1911), endêmica da bacia do rio Iguazu, o que a torna ainda mais importante para o monitoramento de riachos pertencentes a esta bacia hidrográfica. Esta espécie possui corpo e nadadeiras cinzas, mais claro na região ventral. Corpo alongado, arredondado próximo à cabeça, comprimido na região da base da nadadeira adiposa, sem escamas, cabeça deprimida, adiposa longa e boca terminal e barbilhões ao redor da boca (BAUMGARTNER et al., 2012).

Além do interesse econômico e a preocupação com a espécie, os peixes são utilizados como bioindicadores devido a elevada disponibilidade de informações sobre o ciclo de vida de grande número de espécies de peixes, bem como por incluírem uma grande variedade de níveis tróficos (ARAÚJO, 1998), uma vez que todos os peixes são sensíveis as alterações das variáveis físicas e químicas da água (AURORA-PIS et al., 2008), as quais podem ser alteradas pelas atividades humanas (CHOVANEC; HOFER; SCHIEMER, 2003).

Os agentes de maior potencial na degradação dos ambientes aquáticos são os agrotóxicos que, por meio do deflúvio superficial de áreas agrícolas, escoam substâncias orgânicas ou inorgânicas, naturais ou sintéticas (RESENDE, 2002). Os peixes podem ser afetados pela exposição direta aos agrotóxicos aplicados para eliminar ou controlar possíveis agentes patogênicos (TAVECHIO; GUIDELLI; PORTZ, 2009) e por controle direto de ervas daninhas que circundam tanques usados para piscicultura (VICK, 2010). Podem ser afetados indiretamente por compostos xenobióticos que atingem mananciais e

rios, decorrentes da elevada descarga de efluentes industriais, domésticos e pela agricultura (RESENDE, 2002).

Dentre os agrotóxicos mais utilizados atualmente pode-se citar o herbicida não-seletivo glifosato, um sal isopropilamínico de glicina, que, segundo as empresas fabricantes, é menos propenso a mover ou persistir no solo e águas superficiais e apresenta baixa toxicidade para mamíferos (DUKE; POWLES, 2008), e compostos organofosforados. Estes últimos são utilizados tanto na aquicultura quanto na agricultura, para o controle de patógenos, sendo inseticidas que tem como função a inibição da atividade da enzima colinesterase no núcleo nervoso central de invertebrados. São considerados muito tóxicos para os seres vivos, mas por serem moléculas mais hidrossolúveis e instáveis no ambiente são mais utilizados (SILVA; CAMPOS; BOHM, 2013).

Para se compreender a dinâmica e os efeitos dos agrotóxicos no ambiente e nos seres vivos, pesquisadores têm utilizado como ferramenta os experimentos manipulativos e naturais. Experimentos manipulativos são realizados visando um maior controle das variáveis, e permitem maior confiança nas interferências sobre causa e efeito, mas são limitados a escalas espaciais relativamente pequenas e curtos períodos de tempo (GOTELLI; ELLISON, 2011).

Experimentos naturais avaliam a ação de inúmeras variáveis intervenientes que podem afetar o comportamento animal e alterar a estrutura da comunidade (GOTELLI; ELLISON, 2011). Comunidades biológicas dos sistemas fluviais são assembleias de organismos adaptados a condições regionais, incluindo o ambiente físico e recursos alimentares, e são ainda refinadas por meio de interações com outras espécies (ALLAN; CASTILLO, 2007). Desta forma, experimentos naturais permitem avaliar a diminuição da riqueza de espécies em ambientes afetados.

O presente manuscrito foi dividido em dois artigos científicos, sendo o primeiro intitulado “Atividade do sistema antioxidante e efeitos neurotóxicos em larvas de *Rhamdia quelen* em exposição aguda ao glifosato”, e o segundo, “Avaliação do sistema antioxidante e neurotoxicidade em *Rhamdia branneri* (Teleostei: Heptapteridae) coletadas em riachos da bacia do baixo Iguazu”. Esta sequência de artigos tem como proposta realizar a análise em ambiente controlado, mas também realizar a avaliação em ambientes naturais.

Com isso, espera-se que este manuscrito possibilite uma reflexão sobre os efeitos de agrotóxicos presentes em ambientes controlados, mas também em situações de

sinergismo com outras variáveis intervenientes. Desta forma, será possível estabelecer relações de efeito estático, mas também em modelos estocásticos.

REFERÊNCIAS

ALLAN, J. D.; CASTILLO, M. M. **Stream ecology: structure and function of running waters**. 3ª ed. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2007.

ARAÚJO, F. G. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do Sul. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 547–558, 1998.

AURORA-PIS, M. et al. Efecto de la emisión de residuales urbano-industriales en la enseada de la Coloma, costa sur de Pinar del Río, Cuba. **Revista Eletronica de Veterinaria**, v. 9, n. 5, 2008.

BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004.

BAUMGARTNER, G. et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. Maringá: Eduem, 2012.

BOCKMANN, F. A.; GUAZZELLI, G. M. Family Heptapteridae (Heptapterids). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. (Eds.). . **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 406–431.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: **Bioindicators and biomonitoring- Principles, Concepts and Applications**. [s.l: s.n.]. v. 6p. 639–676.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 1, p. 319–325, 2008.

GOMES, L. DE C. et al. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de Estatística Em Ecologia**. [s.l.] ARTMED, 2011.

KREUTZ, L. C. et al. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish and Shellfish**

Immunology, v. 29, p. 694–697, 2010.

RESENDE, Á. V. **Agricultura e qualidade da Água : Contaminação da Água por Nitrato**. Planaltina: [s.n.].

SILVA, M. R. DA; CAMPOS, A. C. E. DE; BOHM, F. Z. AGROTÓXICOS E SEUS IMPACTOS SOBRE ECOSISTEMAS AQUÁTICOS CONTINENTAIS. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 2, p. 46–58, 2013.

TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. ALTERNATIVAS PARA A PREVENÇÃO E O CONTROLE DE PATÓGENOS EM PISCICULTURA. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335–341, 2009.

VICK, B. **Glyphosate application in aquaculture** United States Patent Application Publication, 2010.

Capítulo I

Atividade do sistema antioxidante e efeitos neurotóxicos em larvas de *Rhania quelen* em exposição aguda ao glifosato

Artigo apresentado em defesa de dissertação de Mestrado

Artigo a ser enviado para a Revista Chemosphere

1 **Atividade do sistema antioxidante e efeitos neurotóxicos em larvas de *Rhamdia***
2 ***quelen* em exposição aguda ao glifosato**

3
4 Thaís Maylin Sobjak^{1*}, Silvia Romão², Cristian Zwetzech do Nascimento³ e Ana Tereza
5 Bittencourt Guimarães¹

6
7 ¹Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual
8 do Oeste do Paraná. Cascavel-PR. ²Universidade Federal da Fronteira Sul. Laranjeiras do
9 Sul-PR. ³Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Universidade
10 Estadual do Oeste do Paraná. Toledo-PR. * thais.sobjak@hotmail.com

11
12 **RESUMO**

13 O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do glifosato sobre o sistema
14 antioxidante, bem como efeitos neurotóxicos em larvas de *Rhamdia quelen*. Foi realizado
15 um delineamento inteiramente casualizado com ovos de jundiá distribuídos em 48
16 recipientes com 300 mL de água, os quais foram subdivididos aleatoriamente em grupos
17 controle e tratado com glifosato (6,5 mg/L). Estes foram avaliados em quatro tempos (12,
18 24, 48 e 72 horas), cada qual com seis repetições. Em cada tempo foi avaliado a taxa de
19 sobrevivência dos ovos/larvas (%), e coletadas amostras para as análises relativas ao
20 sistema antioxidante (catalase - CAT, glutathione transferase- GST, glutathione reductase -
21 GR, e lipoperoxidação - LPO), e avaliação neurotóxica (colinesterases). Ao longo das 72
22 horas de experimentação, houve maior taxa de sobrevivência entre os animais tratados
23 com glifosato, contudo foi detectada indução precoce do sistema antioxidante e efeitos
24 colinérgicos. Em 12 horas foi o maior valor de Resposta Integrada de Biomarcadores
25 (RIB=1,26) havendo indução da enzima colinesterase e GR. Em 24 horas, o valor de RIB
26 foi de -2,56, havendo inibição da enzima colinesterase e indução de GR. Em 48 horas, o
27 valor foi de -0,76, havendo indução de LPO. Por fim, o valor mais baixo de RIB foi em
28 72 horas (-4,65), havendo indução da GST e inibição dos demais biomarcadores. Por fim,
29 foi possível detectar o efeito agudo do glifosato ao longo do desenvolvimento inicial de
30 *R. quelen*, observando-se a diminuição do controle do sistema antioxidante e efeitos
31 neurotóxicos.

32 **Palavras-chave:** herbicida; jundiá; estresse oxidativo; larvicultura

33

1 **1. Introdução**

2 O herbicida não-seletivo glifosato é um sal isopropilamínico de glicina, que foi
3 lançado no mercado agrícola, em 1974, para o controle de ervas daninhas em cultivares
4 (Duke e Powles, 2008). Em 2013, o glifosato representou cerca de 40% do consumo de
5 agrotóxicos no Brasil, quando foram comercializadas 186 mil toneladas da substância
6 (Bento Filho, 2015).

7 O sucesso comercial foi decorrente de sua boa translocação em plantas, bem
8 como da rápida inativação do produto por microrganismos do solo, e de sua baixa
9 toxicidade para demais organismos. A ação principal do glifosato é sobre a via do ácido
10 chiquimato, inibindo a atividade da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintetase,
11 e conseqüentemente, interfere na síntese dos aminoácidos aromáticos: fenilalanina,
12 tirosina e triptofano (Amrhein et al., 1980). Esta via bioquímica é encontrada em plantas
13 superiores, algas e algumas bactérias, as quais podem sofrer ação do glifosato (Christy et
14 al., 1981; Shehata et al., 2013; Wong, 2000). A segunda razão para o seu sucesso
15 comercial ocorreu com a introdução de plantas transgênicas resistentes ao glifosato,
16 fazendo com que o herbicida aja somente sobre as plantas daninhas. Atualmente é o
17 herbicida mais vendido no mundo, usado em áreas agrícolas e não agrícolas (Myers et al.,
18 2016).

19 Apesar da ampla comercialização deste herbicida, pesquisas recentes têm
20 mostrado que o glifosato provoca alterações no metabolismo de diversos organismos,
21 como invertebrados (Cuhra et al., 2015; Deepananda et al., 2011), anfíbios (Relyea, 2005;
22 Rissoli et al., 2016), peixes (Kreutz et al., 2010; Langiano and Martinez, 2008), ratos
23 (Benedetti et al., 2004) e humanos (Gasnier et al., 2009; Thongprakaisang et al., 2013).

24 O problema maior do uso contínuo e descontrolado deste herbicida é sua ação
25 sobre os organismos não-alvo. Nestes organismos, o principal efeito relatado é o aumento
26 na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), tal como
27 o íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (-OH) (Cogo
28 et al., 2009; Rondón-Barragán et al., 2012). As ROS são propensas a causar danos
29 potencialmente tóxicos, mutagênicos ou cancerígenos devido à sua alta reatividade
30 iônica. Os alvos para os danos das ROS incluem os principais grupos de biomoléculas,
31 como DNA, lipídeos e proteínas (Nordberg e Arnér, 2001).

32 Os sistemas celulares antioxidantes atuam para mitigar os efeitos das ROS,
33 podendo ser divididos em dois grupos principais: enzimáticos e não-enzimático. Os
34 sistemas de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutatiónas), bem

1 como reações de membranas (lipoperoxidação) podem ser utilizadas como biomarcadores
2 de estresse oxidativo (Nordberg e Arnér, 2001). Para compreender os efeitos de agentes
3 xenotóxicos, avalia-se a atividade de biomarcadores bioquímicos, permitindo antecipar
4 mudanças que podem ocorrer em um ambiente (Freire et al., 2008).

5 Apesar dos inúmeros estudos avaliativos do efeito de glifosato sobre adultos de
6 organismos não-alvo, ainda há um interesse especial sobre o seu efeito em organismos
7 em fase inicial de desenvolvimento, em especial organismos de vida aquática. O impulso
8 da larvicultura do peixe *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824), também
9 chamado de jundiá, gerou um modelo para otimizar a produtividade de peixes em diversas
10 regiões do Brasil (Kreutz et al., 2010). Esta espécie nativa pertence a ordem Siluriforme,
11 classe Actinopterygii e família Heptapteridae (Bockmann e Guazzelli, 2003). Apresenta
12 distribuição desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (Baldisserotto e Radunz
13 Neto, 2004). Sua ampla distribuição geográfica, bem como tolerância aos meses de
14 inverno, elevada taxa de reprodução e ganho rápido de peso durante os meses mais
15 quentes do ano (Gomes et al., 2000) são os principais motivos para o seu interesse na
16 piscicultura.

17 Entretanto, há uma grande preocupação sobre a contaminação de ovos e larvas de
18 peixes, uma vez que pisciculturas geralmente são construídas em áreas próximas a
19 cultivares, e, portanto, expostas aos agrotóxicos. Além disso, o glifosato tem atingido
20 diretamente espécies cultivadas, especialmente porque tem sido utilizado para controle
21 de plantas aquáticas em tanques de cultivo (Vick, 2010).

22 Diante do exposto, o glifosato pode agir indiretamente sobre espécies não-alvo,
23 em especial quando este produto é lixiviado até o leito dos rios, ou então pode agir
24 diretamente quando aplicado em tanques de cultivo. Desta forma é necessário entender e
25 antecipar as remediações para os possíveis danos que organismos em estágio larval
26 estejam sofrendo. Por isso, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos neurotóxicos
27 promovidos pelo herbicida glifosato, bem como ações sobre sistema antioxidante em ovos
28 e larvas do peixe *Rhamdia quelen*.

30 **2. Material e Métodos**

32 *2.1 Delineamento experimental*

33 O trabalho foi conduzido na Universidade Federal da Fronteira Sul- UFFS-
34 Laranjeiras do Sul-PR, no mês de fevereiro de 2016, após autorização pelo Comitê de

1 Ética de Uso Animal da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Os reprodutores
2 provenientes de estações comerciais de cultivo foram transferidos para o Laboratório de
3 Patologia Animal, e separados por sexo foram mantidos em duas caixas de polietileno
4 com 500 L de água com aeração constante e temperatura ambiente.

5 Nove fêmeas que apresentavam ventre abaulado, abertura da papila urogenital
6 levemente inchada e avermelhada foram selecionadas, bem como 4 machos que
7 liberavam esperma sob leve pressão abdominal contendo o orifício genital protraído
8 (Baldisserotto e Gomes, 2013; Baldisserotto e Radunz Neto, 2004). Os animais foram
9 induzidos a reprodução utilizando extrato hipofisário de carpa (EHC), o qual fora
10 macerado e diluído em soro fisiológico. O extrato foi injetado na musculatura da região
11 dorsal dos reprodutores e matrizes, sendo que as fêmeas foram pesadas individualmente
12 e receberam uma dose preparatória de 0,5 mg EHC.Kg⁻¹ e, após 10 horas, uma segunda
13 dose de 5,0 mg EHC.Kg⁻¹. Os machos receberam uma dose única de 2,5 mg EHC.Kg⁻¹
14 no mesmo horário da aplicação da segunda dose nas fêmeas.

15 Após as aplicações dos extratos hipofisários, a temperatura da água foi monitorada
16 de hora em hora, e a liberação dos gametas após a indução hormonal para o *R. quelen* foi
17 estimada entre 220-240 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) (Baldisserotto e Radunz
18 Neto, 2004). A coleta dos gametas masculinos foi realizada após um período de 9 horas
19 (225 UTA) por meio de leve massagem na região ventral do animal no sentido céfalo-
20 caudal (Witeck et al., 2011). A primeira gota de sêmen foi desprezada para evitar possível
21 contaminação, ou ativação dos gametas, e o restante foi coletado em um tubo de ensaio.

22 As fêmeas foram extrusadas após 9 horas e 15 minutos (231,2 UTA), de modo
23 similar ao procedimento realizado nos machos, e seus ovócitos foram coletados em
24 recipiente seco e de peso conhecido. O peso total dos ovócitos liberados de cada fêmea
25 foi pesado em balança analítica. Do material coletado das fêmeas foi escolhida àquela
26 com maior peso de ovócitos (56,03g). Três amostras de 0,1 g de ovócitos foram
27 observadas em microscópio estereoscópico, e realizada a estimativa do número relativo
28 de ovócitos por grama de material liberado. Obteve-se uma média de 1.560 ovócitos.g de
29 ovócitos⁻¹.

30 Os ovócitos foram fertilizados com 0,27 mL de sêmen (Bombardelli et al., 2006),
31 sendo que para ativação dos gametas foi adicionado 100 mL de água e realizada
32 movimentação manual dos gametas durante dois minutos. Após a movimentação, o
33 excesso de água foi retirado. Após a fertilização, em um delineamento experimental
34 inteiramente casualizado, amostras de 1 mL dos ovos foram distribuídos em 48

1 recipientes plásticos, contendo 300 mL de água mantidos à temperatura de $24 \pm 0,5^\circ \text{C}$ e
2 oxigenação constante. Estes recipientes foram aleatorizados em grupo Controle ($n=24$) e
3 Tratado com 6,5 mg/L de glifosato ($n=24$), sendo que tal concentração foi considerada
4 como subletal uma vez que a CL50 para alevinos da espécie foi definida como 7,3 mg/L
5 por Kreutz et al. (2008). Em cada tempo de experimentação (12, 24, 48 e 72 horas) foram
6 aleatorizadas seis repetições.

7 Em cada tempo foram contados o número de indivíduos mortos e vivos em cada
8 repetição. Foi realizada a razão entre o número de indivíduos vivos e o número total,
9 definindo-se a taxa de sobrevivência de ovos/larvas por tempo de experimentação.

10

11 *2.2 Análise e preparação do material biológico*

12 As coletas realizadas em 12h, 24h, 48h e 72h após a contaminação, sendo as
13 amostras compostas por um *pool* de todos os indivíduos vivos de cada réplica. As
14 amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão Tris HCl pH 7,4 e centrifugados a
15 12.000g por 10 minutos, a 4°C . O homogenato de todos os indivíduos foi congelado à -
16 20°C para posteriores análises.

17

18 *2.3 Dosagem proteica*

19 A quantificação de proteína das amostras foi determinada pelo método de
20 Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976). Todas as
21 amostras foram então normalizadas para 1 mg de proteína/mL.

22

23 *2.4 Dosagem enzimática associada à neurotoxicidade*

24 A análise da atividade da enzima colinesterase (ChE) foi realizada por meio do
25 método de Ellman et al. (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998),
26 cujo princípio é a mensuração da produção da tiocolina quando a acetiltiocolina é
27 hidrolisada. Isso é feito pela reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-
28 nitrobenzoato para produzir o ânion de coloração amarelada do ácido 5-tio-2-
29 nitrobenzóico.

30 A reação foi realizada em triplicata, em 300 μL de solução contendo 0,05mM de
31 ácido 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e 1,5mM de Acetiltiocolina (ATC). Foi
32 calculada a atividade da ChE em relação a concentração de proteína (mg/mL), usando o
33 coeficiente de extinção molar do DTNB ($1,36\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A quantificação da proteína foi

1 calculada a partir da amostra bruta e a leitura realizada a 22°C. Os resultados foram
2 expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prote\acute{a}na}^{-1}$.

3

4 *2.5 Dosagem enzimática associada ao sistema antioxidante*

5 A atividade da Catalase (CAT) foi acompanhada pelo decréscimo da absorbância
6 a 240nm (Aebi, 1984), a partir do princípio de dismutação do peróxido, cujo coeficiente
7 de extinção molar é de $40 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. As duplicatas, em 2 mL de solução em uma cubeta
8 de quartzo a 25°C, apresentaram concentração final de 0,01 mg de proteína. mL^{-1} , sendo
9 que o meio de reação apresentou concentrações finais de 13,5mM de H_2O_2 , 50 mM de
10 TRIS-HCl pH 8,0 e 0,25 mM de EDTA. Os resultados da atividade da enzima catalase
11 foram expressos em $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\acute{a}na}^{-1}$.

12 O princípio da análise da atividade da Glutathione transferase (GST) é de que a
13 enzima catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato sintético
14 CDNB que produz um conjugado detectado em 340nm (Habig et al., 1976). Durante o
15 ensaio, a atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto
16 conjugado. O ensaio foi realizado em triplicata, em microplaca, sendo que a amostra
17 apresentou concentração final de 0,020 mg de proteína. mL^{-1} . O meio de reação apresentou
18 concentrações finais de 0,94 mM de CDNB e 0,94 mM de GSH. A leitura foi realizada à
19 22°C. O coeficiente de extinção molar do conjugado GSH/CDNB é $9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ e a
20 unidade foi expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\acute{a}na}^{-1}$.

21 A Glutathione reductase catalisa a redução da glutathione dissulfeto (GSSG) através
22 da oxidação do NADPH, cujo decréscimo de absorbância é medido a 340nm (Sies et al.,
23 1979). O ensaio foi realizado em duplicata, em microplaca, o meio de reação apresentou
24 concentrações finais de 0,138 mM de NADPH, 3,81 mM de GSSG e 3,75 mM de EDTA.
25 A reação foi realizada à 22°C. O coeficiente de extinção molar do NADPH é $6,22 \text{ mM}^{-1}$
26 $\cdot\text{cm}^{-1}$. A unidade foi expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\acute{a}na}^{-1}$.

27 A determinação da reação de lipoperoxidação (LPO) foi realizada com objetivo
28 de quantificar indiretamente os peróxidos, refletindo assim a intensidade da peroxidação
29 lipídica (Lushchak et al., 2009). Foi realizado o método de TBARS (Buege e Aust, 1978),
30 realizando comparações de absorbância com curva de padrões de Malondialdeído
31 (MDA), principal subproduto de peroxidação lipídica celular. Para preparação da amostra
32 o meio contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína da amostra em ácido tricloroacético
33 (TCA) 6,7% em volume final de 180 μL , foi agitado em vórtex, deixado em banho de
34 gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 12000g a 4 °C. Para a dosagem das

1 substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 40 µL do sobrenadante, assim
2 como de diferentes concentrações de MDA foram adicionados em microplaca, em
3 triplicata, a meio de reação contendo 21,42 mM de TBA, 17,86 mM de NaOH (utilizado
4 para solubilização do TBA), 0,73 M de TCA, 0,032mM de BHT, etanol 3% (utilizado
5 para solubilização do BHT) em PBS. A leitura da reação foi realizada à 22°C, após 60
6 minutos de incubação a 60°C, em uma absorvância de 535 nm. Os resultados da
7 peroxidação lipídica foram expressos em nmol de MDA.mg de proteína⁻¹.

8

9 *2.6 Resposta Integrada de Biomarcadores*

10 A partir dos resultados obtidos com os biomarcadores, foi calculado o índice de
11 Resposta Integrada de Biomarcadores (RIB), descrito por Beliaeff and Burgeot (2002) e
12 modificado por Sanchez et al. (2013). Para o cálculo do RIB, foi realizada a razão entre
13 os dados dos biomarcadores das amostras do grupo Tratado e a média das réplicas de cada
14 horário do grupo Controle. Cada razão foi logaritimizada (Y_{i+1}) e então calculadas as
15 médias gerais (μ) e desvios padrão (s). Então, os valores logaritmizados de Y_{i+1} (y_i)
16 foram padronizados pela fórmula: $Z_i = \frac{(y_i - \mu)}{s}$. O mesmo procedimento foi também para
17 o grupo Controle, calculando-se os valores padronizados Z_0 . Foi calculada a diferença
18 entre Z_i e Z_0 (A), que determina o valor de resposta de cada biomarcador em cada horário
19 de exposição. A soma dos valores de A define o valor de RBI para cada horário no grupo
20 exposto ao glifosato. Os dados de cada biomarcador foram representados em gráficos tipo
21 radar, indicando o desvio do biomarcador investigado em relação ao grupo Controle.

22

23 *2.7 Análise estatística*

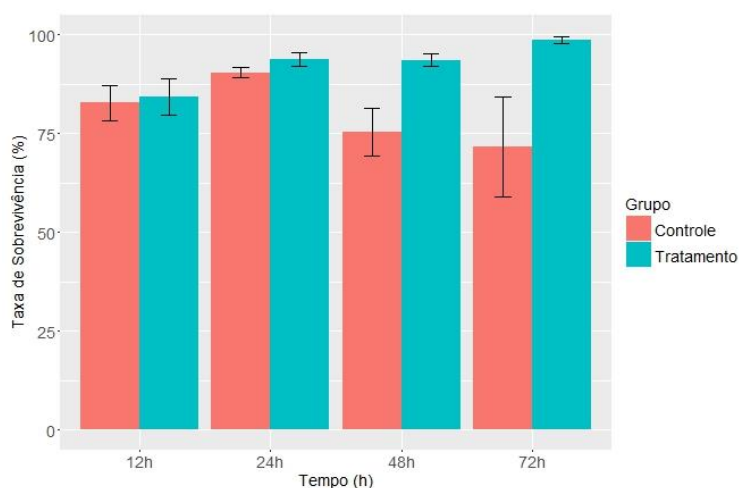
24 As variáveis % de sobrevivência, bem como a razão dos valores (Y_i) de ChE, CAT,
25 GST, GR e LPO, em função das médias dos horários no grupo Controle, foram
26 comparadas entre os grupos e tempos de contaminação, tendo a normalidade dos resíduos
27 verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias por meio do teste
28 de Levene. As variáveis foram analisadas por meio do teste paramétrico ANOVA-fator
29 duplo, seguido do teste de Tukey-HSD. Em todos os testes estatísticos o nível de
30 significância utilizado foi de 0.05.

31 Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R (Core Team, 2015),
32 fazendo uso dos pacotes estatísticos ExpDes.pt (Ferreira et al., 2013), plyr (Wickham,
33 2011) e ggplot2 (Wickham, 2009).

1 3. Resultados

2 Foi possível observar diferenças estatísticas com relação à sobrevivência dos
3 animais entre os grupos e os tempos de exposição ao glifosato ($F_{3; 29}=3,71$; $p=0,022$). A
4 diferença de sobrevivência entre os grupos foi significativa a partir de 48 horas de
5 experimentação, sendo maior no grupo Tratado com glifosato (93%) quando comparado
6 ao grupo Controle (75%) (Fig.1). Vale ressaltar que foi verificada maior atividade
7 natatória entre os animais expostos ao glifosato.

8 Na Tabela 1 são apresentadas as médias e erros padrão dos biomarcadores.



9

10 **Fig. 1.** Taxa de sobrevivência (%) de ovos/larvas de *Rhamdia quelen* nos grupos Controle
11 e Tratado com 6,5 mg/L de glifosato.

12 Tabela 1

13 Atividade de biomarcadores em ovos/larvas de *Rhamdia quelen* não exposto (Controle)
14 e expostos durante 72 horas a 6,5 mg/L de glifosato. Os resultados estão expressos em
15 média \pm EPM para cada grupo em cada tempo de exposição.

		12 h	24 h	48 h	72 h
ChE nmol.min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹	Controle	0,25 \pm 0,023	19,97 \pm 0,67	0,48 \pm 0,05	38,75 \pm 7,9
	Tratado	3,56 \pm 0,26	30,51 \pm 8,4	2,81 \pm 0,38	107,71 \pm 5,4
CAT mmol.min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹	Controle	2,03 \pm 0,65	2,87 \pm 1,08	3,71 \pm 1,05	4,80 \pm 0,99
	Tratado	3,81 \pm 1,46	4,6 \pm 0,67	4,18 \pm 0,64	4,45 \pm 0,87
GST nmol.min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹	Controle	0,094 \pm 0,002	0,091 \pm 0,002	0,089 \pm 0,001	0,092 \pm 0,001
	Tratado	0,092 \pm 0,004	0,089 \pm 0,002	0,083 \pm 0,001	0,096 \pm 0,001
GR nmol.min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹	Controle	0,57 \pm 0,16	0,72 \pm 0,15	0,73 \pm 0,2	0,96 \pm 0,24
	Tratado	1,48 \pm 0,4	1,61 \pm 0,27	1,08 \pm 0,3	0,73 \pm 0,05
LPO nmol TBARS.min ⁻¹ .mg de proteína ⁻¹	Controle	0,82 \pm 0,32	1,06 \pm 0,21	0,07 \pm 0,04	0 \pm 0
	Tratado	0,46 \pm 0,10	1,50 \pm 0,63	0,24 \pm 0,07	0 \pm 0

16 ChE- Colinesterase; CAT- Catalase; GST- Glutaciona S-Transferase; GR-Glutaciona Redutase;
17 LPO- Lipoperoxidação.

18

19 As análises a seguir, foram realizadas com os valores das razões entre grupo
20 Tratado e as médias do grupo Controle, as quais foram consideradas constituintes da linha

1 de base. Ao avaliar a atividade da enzima Colinesterase, a qual é marcadora de efeitos
2 neurotóxicos, houve diferença significativa na interação entre grupos e tempo de
3 experimentação ($F_{3; 29}=60,49$; $p<0,0001$), indicando elevação significativa da atividade
4 enzimática no grupo Tratado com glifosato quando comparado ao grupo Controle em 12h
5 ($Média\pm SE=14,5\pm 1,09$) e 48h ($5,74\pm 0,77$) de experimentação (Fig. 2a).

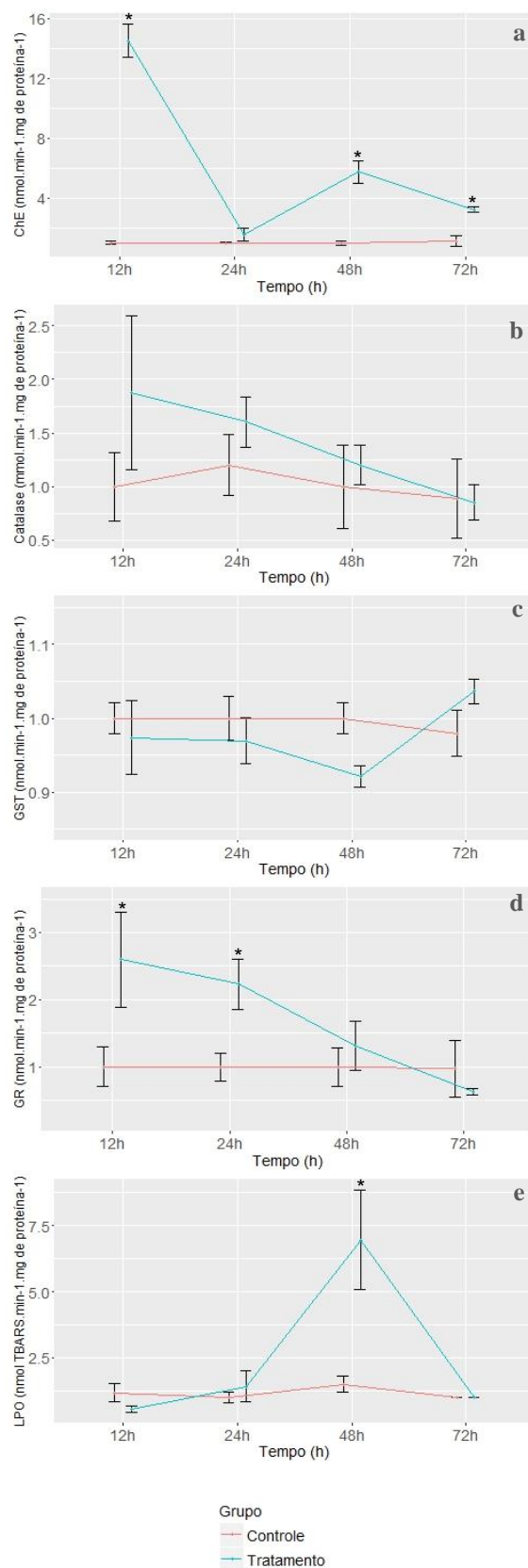
6 Na avaliação da enzima catalase e GST, não houve diferença significativa entre
7 os grupos, assim como entre os horários ($F_{3; 29}=0,53$; $p=0,661$; $F_{3; 29}=1,72$; $p=0,184$,
8 respectivamente) (Figs. 2b-c).

9 Em relação a GR, houve diferença significativa entre os grupos ($F_{1; 29}= 4,78$; $p=$
10 $0,037$), sendo possível observar médias significativamente mais elevadas de sua atividade
11 no grupo exposto ao glifosato quando comparado ao grupo Controle, com destaque
12 especial aos horários de 12h ($2,59\pm 0,70$) e 24h ($2,23\pm 0,37$) de exposição (Fig. 2d).

13 Para a LPO houve diferença significativa na interação entre grupos e tempos de
14 experimentação ($F_{3; 29}=6,5$; $p=0,001$), indicando elevação da reação de lipoperoxidação
15 no grupo Tratado com glifosato em 48h ($6,94\pm 1,88$) de experimentação (Fig. 2e).

16 O índice RIB foi definido para cada horário, mostrando as diferenças observadas
17 no grupo Tratado em relação à linha de base. O valor do índice RIB em 12 horas de
18 experimentação foi igual a 1,26, indicando, portanto, a indução da atividade enzimática
19 da colinesterase e da glutathione redutase (Fig. 3a). Em 24 horas, o valor de RIB reduz
20 para -2,56, indicando forte inibição da atividade enzimática colinesterásica, mas ainda
21 indução da atividade da glutathione redutase e manutenção das atividades das demais
22 enzimas em acordo com a linha de base definida pelo grupo Controle (Fig. 3b). Em 48
23 horas, o valor do índice ainda indica inibição dos biomarcadores, sendo equivalente a
24 -0,76. Neste horário, observou-se a inibição das atividades específicas das enzimas
25 catalase, GR e GST, aumento dos níveis de reação de lipoperoxidação, e equivalência da
26 atividade da colinesterase à linha de base (Fig. 3c). Em 72 horas, temos o maior valor de
27 inibição enzimática, $RIB=-4,65$, em que observamos que apenas a GST está levemente
28 induzida, e as demais enzimas tiveram suas atividades inibidas quando comparadas à
29 linha de base (Fig. 3d).

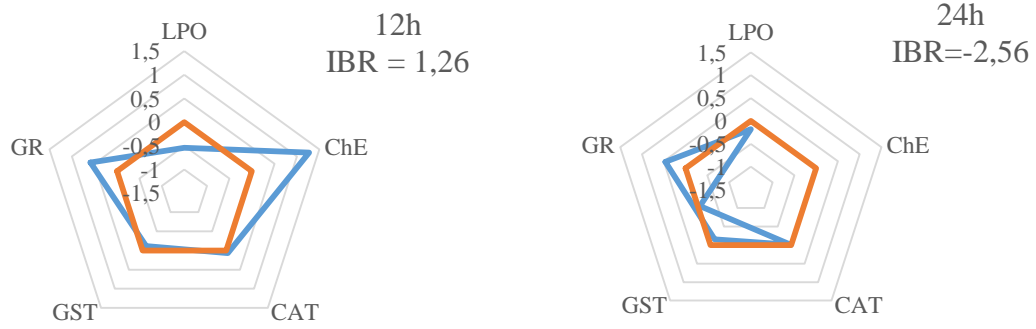
30 Em síntese, observa-se o decréscimo do RIB ao longo do desenvolvimento larval
31 em animais expostos ao glifosato (Fig. 4). Tal fato, sugere que neste período experimental
32 ocorre a indução precoce da atividade colinesterásica e do sistema antioxidante (12h), e
33 a partir de 24 horas observa-se os primeiros efeitos neurotóxicos, seguido da dificuldade
34 de manutenção das atividades do sistema antioxidante nos horários posteriores.



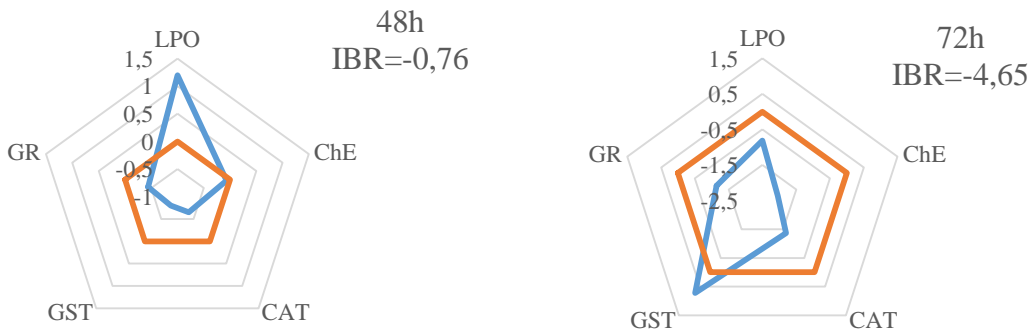
1

2 **Fig. 2.** Atividade de biomarcadores em ovos/larvas de *Rhamdia quelen* expostos a 6,5
 3 mg/L de glifosato (Tratamento) e animais acondicionados apenas em água (Controle), por
 4 diferentes tempos de experimentação (12, 24, 48 e 72 horas). * Diferença com a linha de
 5 base no respectivo tempo, p<0,05. a) Colinesterase (ChE); b) Catalase (CAT); c)
 6 Glutationa Transferase (GST); d) Glutationa Redutase (GR); e) Lipoperoxidação (LPO).

1

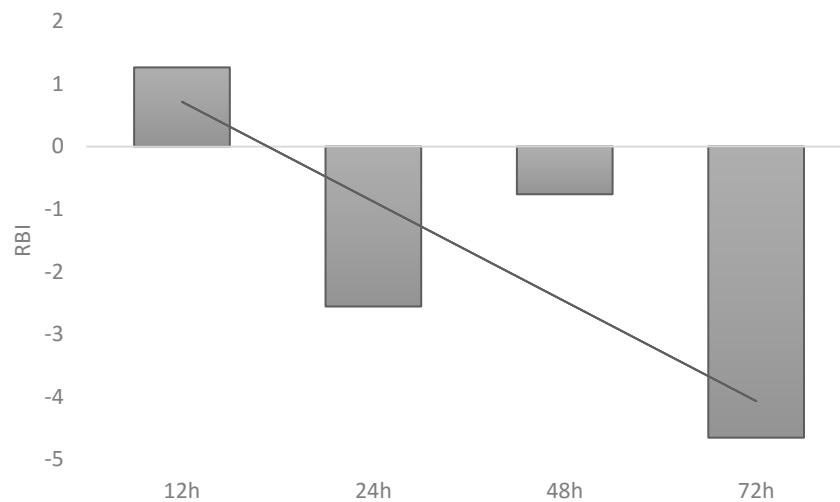


2



3

4 **Fig. 3.** Índice de Resposta de Biomarcadores Integrados (RBI). Colinesterase (ChE),
 5 catalase (CAT), glutiona-S-transferase (GST), glutiona redutase (GR) em diferentes
 6 horários (12h, 24h, 48h e 72h) em *pool* de ovos/larvas de *R. quelen* tratados com glifosato.
 7 Os biomarcadores representam a relação com o grupo Controle (linha de base - laranja).
 8 A área acima do zero representa a indução do biomarcador, enquanto o valor abaixo do
 9 zero representa a inibição do biomarcador.



10

11

Fig. 4. Valores de RBI para os tempos de exposição do grupo Tratado ao glifosato.

1 4. Discussão

2 Foi observada maior taxa de sobrevivência em larvas do grupo Tratado a partir de
3 48 horas, indicando 93% de sobrevivência, enquanto o grupo Controle apresentou 75%
4 de sobrevivência. Graeff et al. (2008) tiveram resultado de 70% de sobrevivência em
5 alevinos de jundiá não contaminados, sendo um dado similar a situação do grupo Controle
6 deste estudo.

7 A alta taxa de sobrevivência, observada entre os animais tratados com glifosato,
8 pode estar relacionada a ação deste produto sobre agentes etiológicos patogênicos aos
9 peixes. Apesar de não ter sido realizada uma análise da qualidade da água para
10 identificação de possíveis patógenos, há evidências na literatura de que o herbicida
11 glifosato age sobre fungos ambientais (Dallmann et al., 2010) e também sobre bactérias
12 (Shehata et al., 2013), podendo, portanto, ter promovido a diminuição de agentes
13 patogênicos nas unidades experimentais dos ovos/larvas tratados. Muitos dos agentes
14 patogênicos que causam doenças em organismos aquáticos são formas facultativas
15 presentes nos sistemas aquáticos. Na natureza, uma elevada frequência de animais
16 aparentemente normais e saudáveis hospeda potenciais agentes patogênicos sem
17 evidência de sinais clínicos ou manifestação de doença (Meyer, 1991). Bactérias, vírus e
18 fungos são os principais agentes causadores de problemas para gametas e embriões de
19 peixes. A transmissão vertical é comum entre as doenças virais, sendo geralmente
20 responsável pela mortalidade de ovos e alevinos, ocorrendo, geralmente, quando os pais
21 são portadores assintomáticos de alguma doença (Brandão, 2004). Os jundiás podem ser
22 portadores de bactérias descritas como patogênicas, tais como: *Plesiomonas shigelloides*,
23 *Aeromonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Edwardsiella*
24 *tarda*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio* sp., *Micrococcus* sp., *Pasteurella* sp. e *Acinetobacter* sp.,
25 os quais causam infecção e aumento da mortalidade de ovos de peixes (Shama et al.,
26 2000). Porém estes agentes patogênicos não foram avaliados no presente estudo.

27 Além da avaliação da taxa de sobrevivência dos animais, foi também realizada a
28 avaliação de efeitos neurotóxicos sobre a atividade enzimática da colinesterase. Esta
29 enzima exerce uma função chave na regulação da transmissão do impulso nervoso,
30 hidrolisando a acetilcolina acumulada na sinapse colinérgica (Becker et al., 2009). Os
31 carbamatos e organofosforados agem inibindo sua atividade, por isso essa enzima é
32 amplamente utilizada como biomarcador de qualidade ambiental (Carvalho et al., 2013).
33 Mas, além da ação inibitória de pesticidas sobre essa enzima, metais pesados e íons
34 metálicos bivalentes podem induzir a atividade da colinesterase (Tsigelny et al., 2000).

1 Apesar de alguns estudos encontrarem inibição da colinesterase pelo glifosato
2 (Gluszczak et al., 2006; Modesto and Martinez, 2010), no presente estudo foi observada
3 indução precoce da atividade enzimática, como observado pelo valor de RIB, sendo mais
4 elevada no grupo Tratado em 12 e 48 horas em relação à linha de base. Ao avaliar o
5 desenvolvimento do animal nesta fase inicial, em 12 horas geralmente se observa a
6 formação da vesícula de Kupffer, bem como o mesencéfalo levemente proeminente
7 (Rodrigues-Galdino et al., 2010), esperando-se, portanto, baixos valores de atividade da
8 colinesterase.

9 De forma similar, a indução desta atividade enzimática foi também observada para
10 a espécie de peixe *Cyprinus carpio* quando expostos ao glifosato (Cattaneo et al., 2011)
11 e aos herbicidas imazetapir e imazapic (Moraes et al., 2011). Salbego et al. (2010)
12 também observaram indução da atividade colinesterásica muscular em *Leporinus*
13 *obtusidens* exposto a baixas concentrações de glifosato. Miron et al. (2005) observaram
14 indução da atividade desta enzima em *Rhamdia quelen* como efeito dos herbicidas
15 clomazone, quinclorac e metil metsulfuron sugerindo que os animais podem compensar
16 o estresse causado pela exposição aos agrotóxicos, aumentando a atividade
17 colinesterásica. Essa ativação da enzima pode representar um aumento na hidrólise do
18 neurotransmissor acetilcolina, com conseqüente decréscimo na ativação dos receptores
19 nicotínicos e muscarínicos.

20 No presente estudo, pudemos observar hiperatividade das larvas expostas ao
21 glifosato quando comparadas ao grupo Controle. A indução ou inibição da colinesterase
22 pode influenciar no processo de neurotransmissão colinérgica e promover efeitos de
23 letargia ou nado errático (Miron et al., 2005). Contudo, vale ressaltar que todos estes
24 estudos foram realizados em peixes adultos, não havendo evidências de atividade da
25 enzima colinesterase em larvas de peixes expostas ao glifosato.

26 Além da avaliação de efeitos neurotóxicos, foi também realizada a avaliação das
27 respostas do sistema antioxidante quando ovos/larvas foram expostos ao glifosato. A
28 enzima catalase (CAT) tem como principal função impedir o acúmulo do peróxido de
29 hidrogênio (H₂O₂), o qual é geralmente resultante da dismutação do superóxido pela
30 enzima superóxido dismutase (Barbosa et al., 2010). No presente estudo, a atividade da
31 enzima CAT em animais tratados com glifosato não apresentou diferença significativa
32 quando comparada aos animais do grupo Controle. A manutenção da atividade da CAT
33 observada neste trabalho foi semelhante aos resultados encontrados por Gluszczak et al.
34 (2007), que também não observaram alterações na atividade desta enzima no fígado de

1 *Rhamdia quelen* expostos a 0,2 e 0,4 mg.L⁻¹ de glifosato por 96 horas, e por Modesto e
2 Martinez (2010), que também não observaram alteração na atividade da enzima para
3 *Prochilodus lineatus* expostos ao mesmo herbicida. A CAT e a enzima Glutathione
4 Peroxidase metabolizam o H₂O₂, gerando H₂O e O₂; se o H₂O₂ não for metabolizado,
5 pode gerar radicais hidroxil (•OH) através da reação de Fenton, que é a mais reativa das
6 ROS agindo especialmente sobre os lipídeos das membranas plasmáticas (Hermes-Lima
7 and Storey, 1993).

8 Contudo, a atividade da CAT pode ser aumentada ou diminuída em ambientes
9 contaminados, dependendo do agente químico. Moraes et al. (2011) observaram aumento
10 da atividade da CAT no fígado de *Cyprinus carpio* no sétimo dia de exposição aos
11 herbicidas imazetapir e imazapic. Porém, Crestani et al. (2007) mostraram redução da
12 atividade da catalase hepática em *R. quelen* expostos ao clomazone. Os resultados
13 encontrados na literatura sobre a atividade dessa enzima são variados e podem ser
14 explicados considerando-se que o potencial antioxidante dos peixes muda de acordo com
15 a espécie, o órgão e o seu habitat (Gluszczak et al., 2007).

16 A GST não teve diferença significativa quando realizada a comparação das médias
17 entre os grupos Controle e Tratado. Porém, observa-se pelo valor de RIB uma indução da
18 sua atividade em 72 horas. Um resultado similar foi observado por Ferreira et al. (2010),
19 que mostraram um aumento na atividade da GST do fígado de *R. quelen* expostos ao
20 glifosato. Modesto e Martinez (2010) também observaram aumento na atividade da GST
21 em *Prochilodus lineatus* após 24 e 96 h exposição ao glifosato, sugerindo que esta
22 elevação é decorrente do aumento do processo de biotransformação do herbicida pelo
23 animal, bem como por ocorrer a metabolização dos lipoperóxidos formados pela reação
24 de Fenton, indicando a ativação dos mecanismos de defesa.

25 A elevação da atividade desta enzima no grupo exposto ao glifosato, durante as
26 primeiras 24 horas de desenvolvimento, é mais um indicativo de que este herbicida induz
27 alterações no sistema antioxidante. Quando um agente oxidante age no citoplasma de uma
28 célula ocorre o aumento da concentração de GSSG e a depleção de GSH. O excesso de
29 GSSG resulta em ambiente mais oxidante, que favorece a formação de pontes dissulfeto
30 (-SS-) em proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH). As pontes dissulfeto oxidam
31 tais proteínas, com prejuízo as suas funções. Esta oxidação é reversível graças a ação da
32 GR, a qual reduz a GSSG à GSH com gasto de NADPH. Desta forma, é possível sugerir
33 que nas primeiras 24 horas de desenvolvimento, quando ocorre o período de eclosão
34 larval, para manter o organismo em homeostase o sistema antioxidante trabalha para a

1 recuperação da GSH (Ferreira e Matsubara, 1997). Nesta etapa frágil do
2 desenvolvimento, observa-se baixa mobilidade prévia à eclosão, com aproximadamente
3 100 batimentos cardíacos por minuto, e ausência de pigmentação (Rodrigues-Galdino et
4 al., 2010).

5 A reação TBARS indicou um aumento na lipoperoxidação, a qual foi induzida
6 para os animais que foram expostos durante 48 horas ao glifosato. Nesta fase do
7 desenvolvimento larval, observam-se os olhos pigmentados, boca como uma abertura
8 elíptica, o início do desenvolvimento dos barbilhões, poro anal, bolsas faríngeas e os
9 opérculos abertos (Rodrigues-Galdino et al., 2010). Logo, nesta fase de desenvolvimento
10 é esperado o aumento da reação de lipoperoxidação em decorrência das inúmeras
11 transformações do organismo do animal.

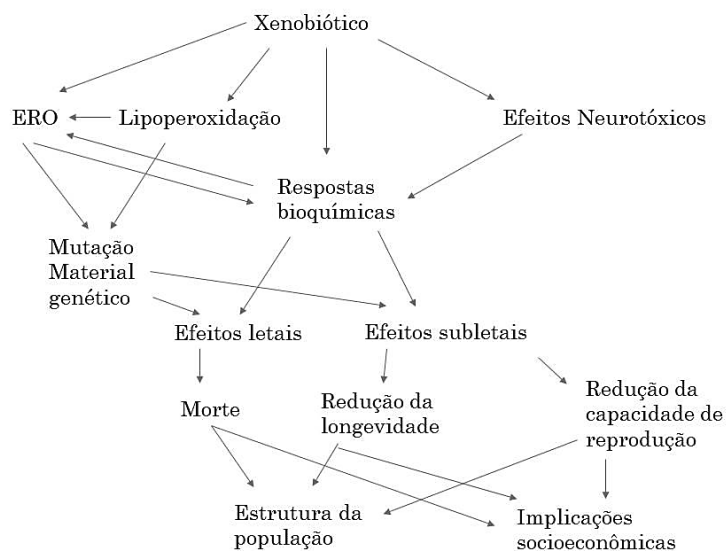
12 Menezes et al. (2011) observaram um aumento também dos níveis de TBARS
13 para *R. quelen* expostos ao glifosato, e posterior diminuição desses níveis, no período de
14 recuperação dos animais. Vieira et al. (2016) obtiveram resultados de aumento de danos
15 genéticos em animais com elevada lipoperoxidação, sugerindo que os produtos desta
16 reação podem agir sobre outros componentes celulares, como os ácidos nucleicos, como
17 consequência de uma maior permeabilidade da membrana celular. Além disso, o radical
18 $\cdot\text{OH}$ também promove o processo de peroxidação lipídica, atuando sobre os carboidratos
19 e as proteínas extrínsecas, bem como nas porções polares fosfolipídicas; uma reação em
20 cadeia dos radicais livres promove dano oxidativo no glicocálix, afetando a função celular
21 e contribuindo para a geração de inúmeras patologias (Halliwell and Gutteridge, 2015).
22 Logo, elevações nos níveis de lipoperoxidação nos deixam alertas para danos que podem
23 não ser visíveis precocemente, mas sim ao longo do desenvolvimento do espécime.

24 Segundo Fränze (2003), a resistência a qualquer forma de estresse é um sistema
25 de propriedades internas inatas de um organismo que pode se opor à produção de uma
26 tensão gerada por um esforço específico, ou ainda ativar um mecanismo de reparação que
27 reverte à tensão. Este sistema tem dois componentes principais: as resistências plásticas
28 e as elásticas. O aumento da resistência plástica irá prevenir (ou pelo menos reduzir) a
29 formação de uma lesão gerada por um fator estressor, o qual poderia promover um efeito
30 ainda mais deletério se o organismo não fosse adaptado. Já a resistência elástica é
31 reversível após a remoção do fator estressor, mas sua ação prolongada pode levar a danos,
32 ou até a morte do organismo afetado. A permanência do agente estressor por um período
33 prolongado leva a transformação de uma resistência elástica em uma resistência plástica,

1 podendo resultar em prejuízos para o organismo, seja para sua sobrevivência como para
2 reprodução.

3 Ao longo do desenvolvimento de um animal, uma exposição suficientemente
4 longa a um fator estressor, como o herbicida glifosato, pode prejudicar ou matar o
5 organismo, e ainda, acabar afetando o desenvolvimento de gerações futuras. Sendo que
6 este indivíduo pertence a uma população, a qual se integra a uma comunidade, o
7 desequilíbrio de sua homeostase pode, a médio e longo prazo, desestabilizar toda a
8 interação da cadeia ecológica.

9 Logo, um xenobiótico, como o glifosato, promove a resistência elástica que se
10 expressa na forma de efeitos neurotóxicos, bem como respostas bioquímicas do sistema
11 antioxidante que podem produzir mutações no material genético de um organismo, as
12 quais podem gerar efeitos letais ou subletais. Quando esta pressão permanece por longo
13 período, pode resultar na resistência plástica, que tem como resposta a redução da
14 longevidade de toda uma população, bem como sua redução na capacidade reprodutiva.
15 Estes dois últimos fatores geram alteração na estrutura de uma população e da
16 comunidade a qual pertence, podendo resultar na perda da biodiversidade. Realizando tal
17 reflexão em ambientes de cultivo de peixes, pode se esperar a redução do plantel e,
18 portanto, inúmeras implicações sócio-econômicas (fig. 5).



19

20 **Fig. 5.** Modelo conceitual da atuação do glifosato sobre ovos/larvas de *Rhamdia quelen*.

21

22 O presente estudo mostra, portanto, evidências de que a exposição aguda do
23 glifosato às larvas de *R. quellen* promoveu efeitos neurotóxicos e alterações da atividade

1 do sistema antioxidante, o que possivelmente leva a um efeito sobre a resistência elástica
2 do animal.

3 **5. Conclusão**

4 Por meio deste estudo pode-se concluir que, apesar dos animais expostos ao
5 glifosato terem maior porcentagem de sobrevivência, ocorreu uma indução precoce da
6 atividade colinesterásica e do sistema antioxidante, seguido da dificuldade da estabilidade
7 das atividades do sistema antioxidante nos tempos posteriores, resultando em uma maior
8 lesão ao nível celular. O estresse que os animais sofreram à exposição ao herbicida
9 glifosato provocou uma alteração no seu metabolismo, que sugere uma característica de
10 resistência elástica.

11 Contudo, observando o dano celular e compreendendo que animais expostos a um
12 fator estressor por um longo período de tempo podem sofrer lesões irreversíveis, as quais
13 podem ser mantidas no seu DNA e propagadas para as gerações posteriores na forma de
14 uma resistência plástica, lança-se a proposta para se realizar trabalhos que comprovem as
15 consequências de exposições crônicas ao glifosato, em especial, pela detecção de
16 alterações neurotóxicas, no sistema antioxidante e ações genotóxicas.

17

18 **Agradecimentos**

19 À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
20 CAPES.

21 **Referências**

22

- 23 Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. doi:10.1016/S0076-
24 6879(84)05016-3
- 25 Amrhein, N., Schab, J., Steinrucken, H.C., 1980. The mode of action of the herbicide
26 glyphosate. *Naturwissenschaften* 67, 356–357. doi:10.1007/BF01106593
- 27 Baldisserotto, B., Gomes, L.C., 2013. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil, in:
28 *Espécies Nativas Para a Piscicultura No Brasil.* p. 302/307.
- 29 Baldisserotto, B., Radunz Neto, J., 2004. Criação de Jundiá. UFSM, Santa Maria.
- 30 Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.D.C.G., De Paula, S.O., Minim, V.P.R.,
31 Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios.
32 *Rev. Nutr.* doi:10.1590/S1415-52732010000400013
- 33 Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M.,
34 Baldisserotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolims of
35 juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1734–1739.
36 doi:10.1016/j.ecoenv.2009.01.006
- 37 Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for
38 ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322.
39 doi:10.1002/etc.5620210629
- 40 Benedetti, A.L., Vituri, C.D.L., Trentin, A.G., Domingues, M.A.C., Alvarez-Silva, M.,

- 1 2004. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-
2 Biocarb®. *Toxicol. Lett.* 153, 227–232. doi:10.1016/j.toxlet.2004.04.008
- 3 Bento Filho, W., 2015. Os venenos na mesa do brasileiro [WWW Document]. INCA-
4 Agência de notícias. URL
5 [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/201](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/os_venenos_na_mesa_dos_brasileiros)
6 [5/os_venenos_na_mesa_dos_brasileiros](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/os_venenos_na_mesa_dos_brasileiros)
- 7 Bockmann, F.A., Guazzelli, G.M., 2003. Family Heptapteridae (Heptapterids)., in: Reis,
8 R.E., Kullander, S.O., Ferraris Jr., C.J. (Eds.), Checklist of the Freshwater Fishes of
9 South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 406–431.
- 10 Bombardelli, R.A., Mörschbacher, E.F., Campagnolo, R., Sanches, E.A., Syperreck,
11 M.A., 2006. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza,
12 *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *Rev. Bras. Zootec.* 35, 1251–1257.
13 doi:10.1590/S1516-35982006000500001
- 14 Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram
15 Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*
16 72, 248–254.
- 17 Brandão, D.A., 2004. Profilaxia e doenças., in: Criação de Jundiá. UFSM, Santa Maria,
18 p. 161–185.
- 19 Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 52,
20 302–310.
- 21 Carvalho, S.J., Menezes, M.S., Guimarães, A., 2013. Analysis of Cholinesterase Enzyme
22 Activity in *Rineloricaria kronei* from Coastal Rivers in Southern Brazil. *Ecotoxicol.*
23 *Environ. Contam.* 8, 87–92. doi:10.5132/eec.2013.01.012
- 24 Cattaneo, R., Clasen, B., Loro, V.L., De Menezes, C.C., Pretto, A., Baldisserotto, B.,
25 Santi, A., De Avila, L.A., 2011. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed
26 to a commercial formulation containing glyphosate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*
27 87, 597–602. doi:10.1007/s00128-011-0396-7
- 28 Christy, S.L., Karlander, E.P., Parochetti J V, 1981. Effects of Glyphosate on the Growth
29 Rate of *Chlorella* on JSTOR. *Weed Sci. Soc. Am.* 29, 5–7.
- 30 Cogo, A.J.D., Siqueira, A.F., Ramos, A.C., Cruz, Z.M.A., Silva, A.G., 2009. Utilização
31 de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Nat.*
32 *line* 7, 37–42.
- 33 Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Santos Miron, D. dos, Spanevello, R., Silveira,
34 A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on
35 biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery
36 pattern. *Chemosphere* 67, 2305–2311. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.09.070
- 37 Cuhra, M., Traavik, T., Dando, M., Primicerio, R., Holderbaum, D.F., Bøhn, T., 2015.
38 Glyphosate-Residues in Roundup-Ready Soybean Impair *Daphnia magna* Life-
39 Cycle. *J. Agric. Chem. Environ.* 4, 24–36. doi:10.4236/jacen.2015.41003
- 40 Dallmann, C.M., Scheneider, L., Bohm, G.M.B., Kuhn, C.R., 2010. Impacto da Aplicação
41 de Glifosato na Microbiota do Solo Cultivado com Soja Geneticamente Modificada.
42 *Rev. Thema* 7.
- 43 Deepananda, K.H.M.A., Gajamange, D., De Silva, W.A.J.P., Wegiriya, H.C.E., 2011.
44 Acute toxicity of a glyphosate herbicide, Roundup®, to two freshwater crustaceans.
45 *J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka* 39. doi:10.4038/jnsfsr.v39i2.3178
- 46 Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag.*
47 *Sci.* 64, 319–325. doi:10.1002/ps
- 48 Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid
49 colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7,
50 88–95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9

- 1 Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças
2 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43, 61–
3 68. doi:10.1590/S0104-42301997000100014
- 4 Ferreira, D., Motta, A.C. d, Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010.
5 Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals.
6 *Chemosphere* 79, 914–921. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.024
- 7 Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., Nogueira, D. A., 2013. *ExpDes.pt: Experimental*
8 *Designs pacakge (Portuguese). R package version 1.1.2.*
- 9 Fränzle, O., 2003. Bioindicators and environmental stress assessment, in: Markert, B.A.,
10 Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (Eds.), *Bioindicators and Biomonitoring*. Elsevier
11 Science Ltd., pp. 41–84. doi:10.1016/S0927-5215(03)80132-7
- 12 Freire, M.M., Santos, V.G., Ginuino, I.S.F., Arias, A.R.L., 2008. Biomarcadores Na
13 Avaliação Da Saúde Ambiental Dos Ecossistemas Aquáticos. *Oecologia Bras.* 12,
14 347–354. doi:10.4257/oeco.2008.1203.01
- 15 Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C., S?ralini, G.E., 2009.
16 Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines.
17 *Toxicology* 262, 184–191. doi:10.1016/j.tox.2009.06.006
- 18 Gluszczak, L., Miron, D. dos S., Crestani, M., Fonseca, M.B., Pedron, F. de A., Duarte,
19 M.F., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase
20 activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*
21). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237–241. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.07.017
- 22 Gluszczak, L., Miron, D. dos S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch,
23 V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and
24 enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol.*
25 - Part C 146, 519–524. doi:10.1016/j.cbpc.2007.06.004
- 26 Gomes, L. de C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000. *Biologia do*
27 *Jundiá Rhamdia quelen (Teleostei, Pimelodidae)*. *Ciência Rural* 30, 179–185.
- 28 Graeff, A., Segalin, C.A., Pruner, E.N., Junior, H.A., 2008. *Produção de alevinos de*
29 *Jundiá (Rhamdia quelen) (No. 140)*. Florianópolis.
- 30 Habig, H., Pabst, J., Jakoby, B., 1976. *Glutathione AA from Rat Liver The glutathione*.
31 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free radicals in Biology and Medicine*, 5^a. ed.
32 Oxford University Press.
- 33 Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1993. In vitro oxidative inactivation of glutathione S -
34 transferase from a freeze tolerant reptile. *Mol. Cell. Biochem.* 124, 149–158.
35 doi:10.1007/BF00929207
- 36 Huber, P.C., Almeida, W.P., Fátima, Â., 2008. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel
37 biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova* 31, 1170–1179.
38 doi:10.1590/S0100-40422008000500046
- 39 Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M.,
40 Marteninghe, A., Da Silva, L.B., 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides
41 on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Cienc. Rural* 38, 1050–1055.
42 doi:10.1590/S0103-84782008000400022
- 43 Kreutz, L.C., Gil Barcellos, L.J., Marteninghe, A., Santos, E.D., Zanatta, R., 2010.
44 Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters
45 the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings
46 (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 29,
47 694–697. doi:10.1016/j.fsi.2010.06.003
- 48 Langiano, V. d C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based
49 herbicide on the Neotropical fish [*i*]Prochilodus lineatus[*/i*]. *Comp. Biochem.*
50 *Physiol. - PartC* 147, 222–231. doi:10.1016/j.cbpc.2007.09.009

- 1 Lushchak, O. V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low
2 toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues.
3 *Chemosphere* 76, 932–937. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.04.045
- 4 Menezes, C.C., Fonseca, M.B., Loro, V.L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto, A.,
5 Morsch, V.M., 2011. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and Recovery
6 Pattern of *Rhamdia quelen*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 665–671.
7 doi:10.1007/s00244-010-9574-6
- 8 Meyer, F.P., 1991. Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.* 69, 4201–
9 4208.
- 10 Miron, D. dos S., Crestani, M., Shetinger, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno,
11 M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone,
12 quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver
13 catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398–403.
14 doi:10.1016/j.ecoenv.2004.12.019
- 15 Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and
16 inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*.
17 *Chemosphere* 78, 294–299. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- 18 Moraes, B.S., Clasen, B., Loro, V.L., Pretto, A., Toni, C., de Avila, L.A., Marchesan, E.,
19 de Oliveira Machado, S.L., Zanella, R., Reimche, G.B., 2011. Toxicological
20 responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing
21 imazethapyr and imazapic. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 328–335.
22 doi:10.1016/j.ecoenv.2009.05.013
- 23 Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G.,
24 Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., Vandenberg, L.N., Vom
25 Saal, F.S., Welshons, W. V., Benbrook, C.M., 2016. Concerns over use of
26 glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus
27 statement. *Environ. Heal.* 15, 1–13. doi:10.1186/s12940-016-0117-0
- 28 Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the
29 mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1287–1312.
30 doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9
- 31 Relyea, R.A., 2005. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species
32 of North American Tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 351–357.
33 doi:10.1007/s00244-004-0086-0
- 34 Rissoli, R.Z., Abdalla, F.C., Costa, M.J., Rantin, F.T., McKenzie, D.J., Kalinin, A.L.,
35 2016. Effects of glyphosate and the glyphosate based herbicides Roundup Original®
36 and Roundup Transorb® on respiratory morphophysiology of bullfrog tadpoles.
37 *Chemosphere* 156, 37–44. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.04.083
- 38 Rodrigues-Galdino, A.M., Maiolino, C.V., Forgati, M., Donatti, L., Mikos, J.D.,
39 Carneiro, P.C.F., Rios, F.S., 2010. Development of the neotropical catfish *Rhamdia*
40 *quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes.
41 *Zygote* 18, 131–44. doi:10.1017/S096719940999013X
- 42 Rondón-Barragán, I.S., Marin-Mendez, G.A., Chacón-Novoa, R.A., Naranjo-Suarez, L.,
43 Pardo-Hernández, D., Eslava-Mocha, P.R., 2012. El glifosato (Roundup®) y
44 Cosmoflux® 411F inducen estrés oxidativo en cachama blanca (*Piaractus*
45 *brachypomus*). *ORINOQUIA* 16, 162–176.
- 46 Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., De Menezes, C.C., Lazzari, R., Radünz Neto, J.,
47 Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects
48 growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters
49 in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 740–745.
50 doi:10.1007/s00244-009-9464-y

- 1 Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.-M., 2013. A novel “Integrated Biomarker
2 Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut.*
3 *Res.* 20, 2721–2725. doi:10.1007/s11356-012-1359-1
- 4 Shama, S., Brandão, D.A., Vargas, A.C. de, Costa, M.M. da, Pedrozo, A.F., 2000.
5 Bactérias com potencial patogênico nos rins e lesões externas de jundiás (*Rhamdia*
6 *quelen*) cultivados em sistema semi-intensivo. *Ciência Rural* 30, 293–298.
7 doi:10.1590/S0103-84782000000200016
- 8 Shehata, A.A., Schrodler, W., Aldin, A.A., Hafez, H.M., Kruger, M., 2013. The Effect of
9 Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry microbiota
10 *In Vitro*. *Curr. Microbiol.* 66, 350–358.
- 11 Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary Glutathione
12 Disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287–290.
13 doi:10.1016/0014-5793(79)81346-0
- 14 Silva de Assis, H.C., 1998. Der einatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom
15 gewässerverschmutzungen. (Ph.D. thesis). University of Berlin, Berlin.
- 16 Team, C., 2015. R: A language and environment for statistical computing.
- 17 Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J.,
18 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors.
19 *Food Chem. Toxicol.* 59, 129–136. doi:10.1016/j.fct.2013.05.057
- 20 Tsigelny, I., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., Südhof, T.C., Taylor, P., 2000. Common EF-
21 hand motifs in cholinesterases and neuroligins suggest a role for Ca²⁺ binding in
22 cell surface associations. *Protein Sci.* 9, 180–185. doi:10.1110/ps.9.1.180
- 23 Vick, B., 2010. Glyphosate application in aquaculture. United States Pat. Appl. Publ.
24 doi:US 2010/0311130 A1
- 25 Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., Oliveira, L.F., Cabrera, L. da C., Risso, W.E.,
26 Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Martinez, C.B. dos R., 2016. Multiple
27 biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure
28 to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Sci. Total Environ.* 542, 44–
29 56. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.071
- 30 Witeck, L., Bombardelli, R.A., Sanches, E.A., Oliveira, J.D.S., Baggio, D.M., Estevão
31 De Souza, B., 2011. Motilidade espermática, fertilização dos ovócitos e eclosão dos
32 ovos de jundiá em água contaminada por cádmio. *Rev. Bras. Zootec.* 40, 477–481.
- 33 Wong, P.K., 2000. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis
34 and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*
35 41, 177–182. doi:10.1016/S0045-6535(99)00408-7
- 36 Wickham, H., 2009. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New
37 York.
- 38 Wickham, H., 2011. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of*
39 *Statistical Software*, 40(1), 1-29. URL <http://www.jstatsoft.org/v40/i01/>.
- 40
- 41

Capítulo II

**Avaliação do sistema antioxidante e neurotoxicidade em *Rhamdia
branneri* (Teleostei: Heptapteridae) coletadas em riachos da bacia do
baixo rio Iguaçu**

Artigo já apresentado no Exame de Qualificação Geral

Artigo enviado a Revista Ecotoxicology and Environmental Safety

1 **Avaliação do sistema antioxidante e neurotoxicidade em *Rhamdia branneri***
2 **(Teleostei: Heptapteridae) coletadas em riachos da bacia do baixo rio Iguaçu**
3

4 Thaís Maylin Sobjak^{1*}, Silvia Romão² e Ana Tereza Bittencourt Guimarães¹
5

6 ¹Pós-graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Universidade Estadual
7 do Oeste do Paraná. Cascavel-PR. ²Universidade Federal da Fronteira Sul. Laranjeiras do
8 Sul-PR.* thais.sobjak@hotmail.com
9

10 **RESUMO**
11

12 O uso de múltiplos biomarcadores tem se mostrado eficaz para avaliação de contaminação
13 ambiental. Neste trabalho o sistema antioxidante e efeitos de neurotoxicidade em
14 *Rhamdia branneri* foram avaliados para compreender a dinâmica da biota associada às
15 variáveis físicas e químicas do ambiente no período de outono e inverno. As coletas foram
16 realizadas em maio e agosto de 2015, em três riachos pertencentes à bacia do baixo rio
17 Iguaçu: rio Manoel Gomes, arroio Pedregulho e córrego Arquimedes. Foram realizadas
18 análises de sedimento, as quais apontaram a presença dos organofosforados Disulfoton,
19 Metilparation e Ronnel Fenclorfos no rio Manoel Gomes e córrego Arquimedes. No
20 outono, houve inibição da atividade da ChE do cérebro ($p < 0,0002$) e músculo ($p < 0,001$)
21 de amostras coletadas no rio Manoel Gomes e córrego Arquimedes. No rio Manoel
22 Gomes foi observada a elevação da LPO ($p = 0,00075$) no período de outono, estando
23 associado a maior utilização de agrotóxicos neste período. No presente estudo, a resposta
24 dos biomarcadores está relacionada à variação temporal, e possivelmente à exposição
25 desses animais à agrotóxicos. Apesar dos riachos estarem localizados em regiões com
26 ampla vegetação circundante, as análises de solo mostram que resíduos de agrotóxicos
27 atingem estas localidades. A biota local respondeu de forma diferente em cada estação,
28 sinalizando que a fauna está em contato com agentes oxidantes e colinesterásicos no
29 período de outono, quando há maior frequência de plantio e uso de agrotóxicos.
30

31 **Palavras-chave:** organofosforado; jundiá; sazonalidade
32
33

34 1. Introdução

35

36 A evolução no meio agrícola ocorreu por meio dos avanços tecnológicos no
37 maquinário, defensivos e transgênicos. Contudo, este avanço fez com que o uso
38 exacerbado e inadequado de agroquímicos promovesse efeitos agudos a espécies não-
39 alvo. Carneiro et al. (2015), em um dossiê da Associação Brasileira de Saúde Coletiva
40 (Abrasco), mencionaram um consumo excessivo de agrotóxicos no Brasil, assumindo o
41 posto de maior mercado mundial de agrotóxicos em 2012. Nesse ano, a escala mundial
42 de consumo de agrotóxicos cresceu em 93%, enquanto no Brasil o consumo de
43 agrotóxicos elevou cerca de 190%. Dentre os estados brasileiros, o Paraná ocupa o
44 segundo lugar na produção de grãos do país (19%) (IBGE, 2016), sendo também um dos
45 maiores consumidores de agrotóxicos (UFPR, 2015).

46 O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), da
47 ANVISA (2014), analisou 1.397 amostras de alimentos em 2012, das quais 347 (25%)
48 foram consideradas insatisfatórias por apresentarem agrotóxicos em níveis acima do
49 Limite Máximo de Resíduo (LMR) e/ou agrotóxicos não autorizados para a cultura. O
50 excesso de agrotóxicos em alimentos para consumo pode acontecer devido aos erros
51 durante a aplicação, que são causados pela falta de treinamento de quem aplica o produto
52 (ANVISA, 2014; Chaim, 2004). O uso inadequado e excessivo promove a seleção de
53 novos patógenos, propiciando, a médio prazo, o aumento da concentração de agrotóxicos
54 aplicados. Como consequência ocorre uma crescente contaminação de mananciais
55 resultante do deflúvio superficial de áreas agrícolas, que escoam essas substâncias
56 orgânicas ou inorgânicas, naturais ou sintéticas (Resende, 2002).

57 Dentre os diversos problemas causados por agrotóxicos, um dos principais está
58 associado à alteração da estrutura da comunidade e consequente diminuição da riqueza
59 de espécies. Comunidades biológicas dos sistemas fluviais são assembleias de
60 organismos adaptados a condições regionais, incluindo o ambiente físico e recursos
61 alimentares, e são ainda refinadas por meio de interações com outras espécies (Allan e
62 Castillo, 2007).

63 Um dos instrumentos utilizados para a compreensão e prevenção do impacto
64 ambiental tem sido o uso de biomarcadores, já que apenas identificar e quantificar os
65 agrotóxicos no ambiente não é suficiente para se compreender os danos causados às
66 comunidades. Os biomarcadores têm especificidades distintas e, em programas de

67 biomonitoramento, o uso de múltiplos biomarcadores tem se mostrado mais eficaz que a
68 avaliação de apenas um indicador de poluição (Freire et al., 2008).

69 Uma das vantagens do biomonitoramento é a avaliação de espécies nativas e
70 endêmicas. *Rhamdia branneri* é uma espécie pertence à ordem Siluriformes e família
71 Heptapteridae. Por muito tempo foi considerada sinonímia da *Rhamdia quelen*, porém
72 segundo os trabalhos de Abucarma e Martins-Santos (2001), esta espécie apresenta
73 diferenças cariotípicas, e Mise et al. (2013) apresentaram diferenças ecomorfológicas
74 entre *R. branneri* e *R. voulezi*. A distribuição geográfica da *R. branneri* é restrita à bacia
75 do rio Iguaçu, o que a torna ainda mais importante para o monitoramento de riachos
76 pertencentes a esta bacia hidrográfica (Baumgartner et al., 2012).

77 O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações neurotóxicas e do sistema
78 antioxidante em *R. branneri* presentes em riachos com diferentes níveis de contaminação
79 ambiental nos períodos de outono e inverno.

80

81 **2. Material e Métodos**

82

83 *2.1 Área de Estudo*

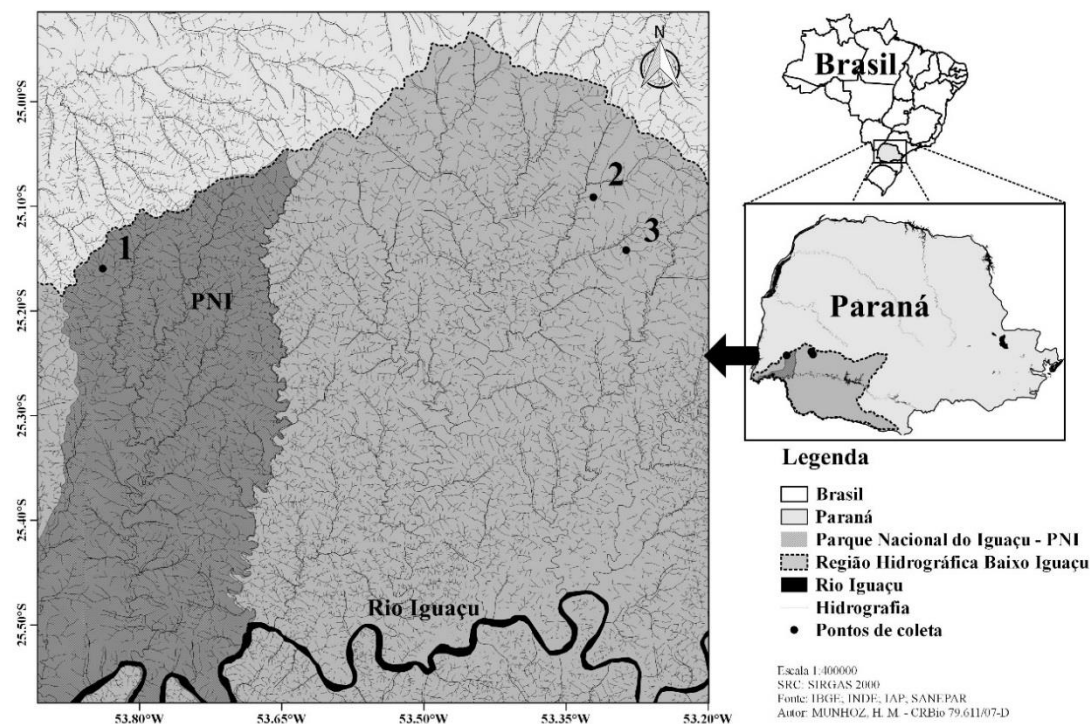
84 A bacia do rio Iguaçu está localizada ao sul do estado do Paraná e compreende
85 101 municípios. A área em estudo localiza-se no terceiro planalto do Estado, sendo que
86 o seu elevado desnível proporciona vantagens para o aproveitamento energético. Suas
87 características geomorfológicas, morfodinâmicas e hidrográficas proporcionaram
88 elevado grau de endemismo de sua ictiofauna (Baumgartner et al. 2012).

89 Os riachos estudados apresentam as seguintes características (Fig. 1):

90 - Rio Manoel Gomes (25°09.723' S 53°49.768' W), afluente do rio Floriano está
91 localizado no Parque Nacional do Iguaçu (PNI), o qual é considerado a maior unidade de
92 conservação no domínio da Mata Atlântica de Interior, sendo um dos últimos
93 remanescentes preservados desse tipo de vegetação no sul do país, com 185.262,5ha
94 (ICMBio, 2016).

95 - Arroio Pedregulho (25°6'6.10' S; 53°18'41.26' W), afluente do rio do Salto está
96 localizado na região rural do distrito Rio do Salto (Cascavel-PR); o local de coleta está
97 incluso em uma unidade de conservação particular, localizada no Sítio Paraíso.

98 - Córrego Arquimedes (25°09.177' S 53°16.657' W), afluente do Rio do Oeste, situado na
99 área rural próximo ao distrito Rio do Salto (Cascavel-PR).



100

101 **Fig.1.** Mapa com indicação dos pontos de coleta. 1. Rio Manoel Gomes, 2. Arroio
 102 Pedregulho, 3. Córrego Arquimedes.

103

104 Os pontos de coleta nos riachos foram classificados em função do uso do solo,
 105 com auxílio do programa Google Earth Pro®. Em cada riacho foi definido um polígono
 106 a partir dos pontos mais altos da microbacia, seguindo à montante a partir do ponto de
 107 coleta. Em seguida, foram delimitadas áreas de remanescentes florestais e áreas rurais
 108 dentro do polígono, definindo-se, assim, percentuais dessas áreas dentro de cada
 109 microbacia.

110 Para a região em estudo foi também avaliado o período de plantio de cultivares
 111 (milho e soja) no ano de 2015. O período de plantio e os primeiros dias de crescimento
 112 dos cultivares está associado ao uso de pesticidas para o controle de pragas. Tais
 113 informações foram obtidas a partir dos dados da Secretaria da Agricultura e do
 114 Abastecimento do Paraná (SEAB, 2016).

115

116 2.2 Análise das variáveis abióticas

117 Nas estações de Outono e Inverno, a temperatura, pH, oxigênio dissolvido,
 118 condutividade e sólidos totais foram coletadas com o uso de uma sonda multiparâmetros
 119 de qualidade da água Horiba U-50.

120

121 2.3 *Análise de água*

122 Na estação de inverno foram realizadas coletas de amostra água dos riachos, sendo
123 amostrados 5L de água, acondicionados em frascos âmbar, devidamente refrigerados e
124 posteriormente, encaminhados para o Laboratório de Qualidade de Água e Limnologia
125 da Universidade Federal do Paraná, em Palotina-PR. As variáveis analisadas foram DBO,
126 sólidos suspensos totais, sólidos totais fixos, sólidos totais voláteis, sólidos totais, fósforo
127 total, N-NH₄, N-NO₃, N-NO₂, N-org, seguindo a metodologia do *Standart Methods*
128 (APHA, 1998).

129 Os valores obtidos para cada ponto de amostragem foram utilizados para a
130 conferência com os parâmetros de referência de águas Classe 1, definidos na resolução
131 n.357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (Conama, 2005),
132 conforme segue:

133 Classe 1: águas que podem ser destinadas:

134 a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento
135 simplificado;

136 b) à proteção das comunidades aquáticas;

137 c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e
138 mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000;

139 d) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se
140 desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção
141 de película; e

142 e) à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

143 144 2.4 *Análises de sedimento dos Riachos*

145 No inverno foi realizada uma análise de resíduos de pesticidas em sedimento dos
146 riachos, no período de inverno, para caracterização da contaminação ambiental. Em cada
147 ponto amostrado foi coletado cerca de 1kg de sedimento dos riachos, acondicionado em
148 saco plástico e posteriormente encaminhado para o Laboratório de Análises Agro-
149 Ambientais (LAAA), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Os compostos
150 organoclorados e organofosforados foram analisados segundo a metodologia descrita por
151 Fernandes et al. (2012), e expressos em partes por bilhão (ppb).

152

153 2.5 *Análise do material biológico*

154 A amostragem de material biológico foi realizada em duas coletas, a primeira no
155 Outono (março/abril-2015) e a segunda, no Inverno (agosto-2015). A técnica de pesca
156 elétrica foi utilizada em um trecho de 50 m do rio, sendo realizadas três passadas
157 sucessivas, com duração aproximada de 40 minutos, no sentido jusante-montante. Após
158 as capturas, os peixes foram anestesiados em cepacaína e realizada a secção medular,
159 seguindo os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal

160 da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Os animais após eutanasiados, tiveram
161 suas vísceras retiradas e em seguida congelados em nitrogênio líquido.

162 Na estação de Outono foram amostrados 35 peixes e no Inverno, 27 peixes. Após
163 as coletas, o material biológico foi encaminhado ao Laboratório de Ecologia de Peixes da
164 Universidade Estadual do Oeste do Paraná, descongelados, porém mantidos resfriados.
165 Os animais foram devidamente pesados (peso total, peso visceral e peso gonadal) e
166 mensurados (comprimento padrão e comprimento total).

167

168 *2.6 Dosagem enzimática associada com neurotoxicidade*

169 A quantificação de proteína das amostras foi determinada pelo método de
170 Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976).

171 As porções do cérebro e parte da musculatura do pedúnculo caudal foram
172 separadas, homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato pH 7,4 e centrifugados a 9.500 g
173 por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, a análise da atividade da enzima colinesterase (ChE)
174 foi realizada com o objetivo de avaliar o efeito de possível contaminação por pesticidas
175 organofosforados e carbamatos. A análise foi realizada por meio do método de Ellman et
176 al. (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998), cujo princípio é a
177 mensuração da produção da tiocolina quando a acetiltiocolina é hidrolisada. Isso é feito
178 pela reação contínua do tiol com o íon 5: 5 ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o anion
179 amarelo do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico.

180 A reação foi realizada em triplicata, em 300 uL de solução contendo 0,05mM de ácido
181 5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) e 1,5mM de Acetiltiocolina (ATC). Foi calculada
182 a atividade da ChE em relação a concentração de proteína (mg/mL), usando o coeficiente
183 de extinção molar do DTNB ($1,36\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). A quantificação da proteína foi calculada
184 a partir da amostra bruta e a leitura realizada a 22°C. Os resultados foram expressos em
185 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$.

186

187 *2.7 Dosagem enzimática associada com sistema antioxidante*

188 Outra porção da musculatura do pedúnculo caudal foi homogeneizada em tampão
189 Tris HCl pH 7,4, na proporção de 1:5, e centrifugadas a 13680g por 10 minutos, a 4°C.
190 A partir deste homogenato, foram realizadas as análises de estresse oxidativo.

191 A determinação da lipoperoxidação (LPO), com objetivo de quantificar
192 indiretamente os peróxidos produzidos refletindo a intensidade da peroxidação lipídica
193 (Lushchak et al., 2009), foi realizada por meio do método de TBARS, mensurada a

194 absorvância de 535nm (Buege e Aust, 1978), a partir de comparação com curva de
195 padrões de Malondialdeído (MDA), principal subproduto de peroxidação lipídica celular.
196 Para preparação da amostra o meio contendo alíquota de 0,33 mg/mL de proteína da
197 amostra em ácido tricloroacético (TCA) 6,7% em volume final de 180 μ L, foi agitado em
198 vórtex, deixado em banho de gelo por 5 minutos e centrifugado por 5 minutos a 13680
199 rpm a 4 °C. Para a dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 40
200 μ L do sobrenadante, assim como de diferentes concentrações de MDA foram adicionados
201 em microplaca, em triplicata, a meio de reação contendo 21,42 mM de TBA, 17,86 mM
202 de NaOH (utilizado para solubilização do TBA), 0,73 M de TCA, 0,032mM de BHT,
203 etanol 3% (utilizado para solubilização do BHT) em PBS. A leitura da reação foi realizada
204 à 22°C, após 60 minutos de incubação a 60 °C. A peroxidação lipídica foi estimada a
205 partir da curva de MDA e os resultados foram expressos como nmol de MDA. mg de
206 proteína⁻¹.

207 A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada de acordo com o método
208 proposto por Crouch et al. (1981) modificado. O princípio desta análise consiste em
209 quantificar o azul de tetrazolium (NBT), mensurada a 560nm durante 1,5 hora. Em meio
210 de reação, a SOD realiza reação de dismutação do íon superóxido a peróxido de
211 hidrogênio, diminuindo a capacidade de oxidação do NBT. Uma alíquota de 0,75 mg/mL
212 de proteína em etanol 25% foi preparada em volume de 800 μ L e centrifugada a 13680 g
213 (4 °C) durante 20 min. A partir do sobrenadante o meio de reação foi preparado em
214 microplaca de 96 poços. Em triplicatas, em volume final de 200 μ L contendo 0,1 mg de
215 proteína.mL⁻¹, 0,09 mM de NBT, 0,015 mM de EDTA, 34,78 mM de sulfato de
216 hidroxilamina, 79 mM de tampão carbonato de sódio pH 10,2 e a placa lida à 22°C. Os
217 valores da atividade das enzimas antioxidantes foram expressos em U/mg de proteína.
218 Uma unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a
219 reação de oxidação de NBT por 50% da inibição máxima.

220 A atividade da Catalase (CAT) foi acompanhada pelo decréscimo da absorvância
221 a 240nm (Aebi, 1984), a partir do princípio de dismutação do peróxido, cujo coeficiente
222 de extinção molar é de 40 M⁻¹.cm⁻¹. Nas duplicatas, em 2 mL de solução em uma cubeta
223 de quartzo, a amostra apresentou concentração final de 0,01 mg de proteína.mL⁻¹, sendo
224 que o meio de reação apresentou concentrações finais de 13,5mM de H₂O₂, 50 mM de
225 TRIS-HCl pH 8,0 e 0,25 mM de EDTA.

226 O princípio da análise da atividade enzimática da Glutathione transferase (GST) é
227 de que a GST catalisa a conjugação da GSH com o substrato sintético CDNB que produz

228 um conjugado detectado em 340nm (Habig et al., 1976). Durante o ensaio, a atividade
229 enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado. O ensaio
230 foi realizado em triplicata, em microplaca, sendo que a amostra apresentou concentração
231 final de 0,020 mg de proteína.mL⁻¹. O meio de reação apresentou concentrações finais de
232 0,94 mM de CDNB e 0,94 mM de GSH. A leitura foi feita à 22°C. O coeficiente de
233 extinção molar do conjugado GSH/CDNB é 9,6 mM⁻¹.cm⁻¹ e a unidade foi expressa em
234 mmol.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

235 A Glutathione redutase catalisa a redução da glutathione dissulfeto (GSSG) através
236 da oxidação do NADPH, cujo decréscimo de absorvância é medido a 340nm (Sies et al.,
237 1979). O ensaio foi realizado em duplicata, em microplaca, o meio de reação apresentou
238 concentrações finais de 0,138 mM de NADPH, 3,81 mM de GSSG e 3,75 mM de EDTA.
239 A reação foi realizada à 22°C. O coeficiente de extinção molar do NADPH é 6,22 mM⁻¹.
240 cm⁻¹. A unidade foi expressa em mmol.min⁻¹.mL⁻¹.mg de proteína⁻¹.

241

242 *2.8 Análise estatística*

243 Todas as análises listadas a seguir foram realizadas no programa R (Core Team,
244 2015). As variáveis biométricas (comprimento total, comprimento padrão, peso total,
245 peso das vísceras e peso das gônadas) e bióticas (ChE, LPO, CAT, SOD) foram
246 comparadas para cada ponto entre as estações, tendo a normalidade verificada pelo teste
247 de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias por meio do teste F. Quando em
248 normalidade e homogeneidade, as variáveis foram analisadas por meio do teste
249 paramétrico T para amostras independentes, e quando não atendiam tais pressupostos, foi
250 aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney-U. Em caso de apenas normalidade,
251 foi realizado o teste T de Welch para variâncias não equivalentes.

252 As matrizes das variáveis abióticas (vegetação e pesticidas) e bióticas (ChE,
253 catalase, lipoperoxidação, superóxido dismutase) foram analisadas por meio da análise
254 de componentes principais (PCA), utilizando o pacote Psych (Revelle, 2015). Para
255 aplicação desta análise, inicialmente foi verificada a normalidade multivariada dos dados
256 pelo teste de Márdia, utilizando o pacote MVN (Korkmaz et al., 2014). Uma vez que tal
257 pressuposto não fora atendido, a análise foi realizada aplicando uma matriz de correlação
258 de Spearman. As cargas fatoriais resultantes dos componentes principais foram avaliadas
259 quanto sua significância por meio da Análise da Variância (Anova) fator duplo,
260 considerando os locais e as estações como fatores fixos. A análise foi realizada utilizando
261 o pacote Agricolae (Mendiburu, 2016), após a verificação do padrão de normalidade dos

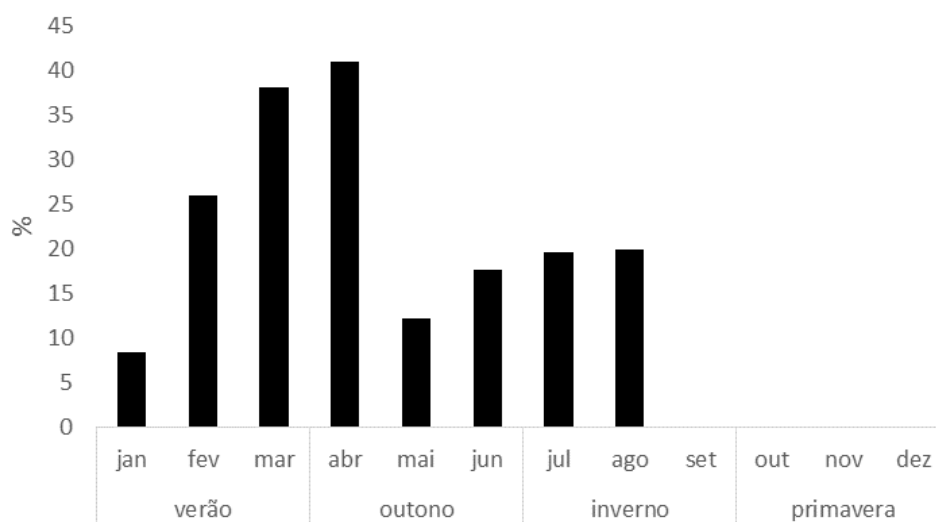
262 resíduos. O teste de acompanhamento utilizado foi o *Least Significant Difference* (LSD).
 263 Em todos os testes estatísticos o nível de significância utilizado foi de 0.05.

264 3. Resultados

265

266 3.1 Período de plantio nas regiões próximas aos locais de coleta

267 A partir das informações obtidas pela SEAB, foi verificado que o maior percentual
 268 de área em plantio ocorreu nos meses de março e abril de 2015, atingindo 79% do total
 269 da área destinada ao plantio na região oeste do estado do Paraná (Fig. 2).



270

271 **Fig. 2.** Percentual de área de plantio na região oeste do Paraná. SEAB, 2016.

272

273 3.2 Variáveis abióticas e análise de água dos riachos

274 As variáveis abióticas analisadas encontraram-se em acordo com os parâmetros
 275 de águas Classe 1 estabelecidos pela resolução N° 357/2005 do CONAMA. A única
 276 exceção foi para a variável DBO do rio Manoel Gomes, que apresentou valores elevados
 277 quando comparados ao valor de referência. Para esta variável, este riacho foi classificado
 278 em águas de Classe III, as quais podem ser destinadas ao abastecimento para consumo
 279 humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas,
 280 cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à
 281 dessedentação de animais (Tabelas 1 e 2).

282 **Tabela 1**
 283 Análise de parâmetros físicos e químicos das águas dos riachos obtidos nas estações de
 284 Outono e Inverno.

VARIÁVEIS	P1		P2		P3		VR
	Outono	Inverno	Outono	Inverno	Outono	Inverno	
TEMPERATURA	15,73	18,85	16,34	17,18	16,46	17,15	na
PH	7,07	6,9	6,37	7,02	6,53	7,10	6,0-9,0
OD (MG L ⁻¹)	9,37	9,20	12,25	9,17	10,47	10,95	6,0
ST (G L ⁻¹)	0,027	0,03	0,00	0,019	0,019	0,013	na

285 P1 – Rio Manoel Gomes. P2 – Arroio Pedregulho. P3 – Córrego Arquimedes. VR - Valores de Referência
 286 da Resolução n. 357/2005 do CONAMA para águas classe I – destinadas ao abastecimento para consumo
 287 humano, após tratamento simplificado. OD- Oxigênio Dissolvido; ST- Sólidos Totais. na – valor de
 288 referência ausente.

289
 290 **Tabela 2**
 291 Análise de parâmetros físicos e químicos das águas dos riachos obtidos no Inverno.

VARIÁVEIS	P1	P2	P3	VR
FÓSFORO (MG.L ⁻¹)	0	0,071	0	0,1
NITRITO (MG.L ⁻¹)	0,0025	0,0070	0,0060	1,0
DUREZA (MG.L ⁻¹)	17,3	12,7	9,6	na
ALCALINIDADE (MG.L ⁻¹)	31,3	22,1	31,6	na
DBO(MG.L ⁻¹)	8*	0,2	0,2	3,0
STV (MG.L ⁻¹)	10	58	28	na
STF (MG.L ⁻¹)	60	12	50	na
STD (MG.L ⁻¹)	38	70	48	500mg
SS (MG.L ⁻¹)	31	0	30	na

292 P1 – Rio Manoel Gomes. P2 – Arroio Pedregulho. P3 – Córrego Arquimedes. VR - Valores de Referência
 293 da Resolução n. 357/2005 do CONAMA para águas classe I – destinadas ao abastecimento para consumo
 294 humano, após tratamento simplificado. DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio; STV- Sólidos Totais
 295 Voláteis; STF- Sólidos Totais Filtrados; STD- Sólidos Totais Dissolvidos; SS- Sólidos Suspensos. na –
 296 valor de referência ausente.

298 3.3 Análise de sedimento dos riachos

299 Dentre os pesticidas analisados foram identificados os organofosforados
 300 Disulfoton, Metil Paration e Ronnel Fenclorfos. O local com maior concentração de
 301 pesticidas foi o rio Manoel Gomes (P1), o qual se localiza no interior do Parque Nacional
 302 do Iguaçu, seguido pelo Córrego Arquimedes (P2), localizado em área rural. O arroio
 303 Pedregulho (P3), localizado em uma unidade de conservação particular, não apresentou
 304 contaminação por pesticidas (Tabela 3).

305 **Tabela 3**

306 Análise da concentração de pesticidas nas amostras de sedimento dos riachos.

AGROTÓXICO (PPB)	P1	P2	P3
DISULFOTON	6,81	0	0
METIL PARATION	6,35	0	6,31
RONNEL FENCLORFOS	0,83	0	0
TOTAL	13,99	0	6,31

307 P1 – Rio Manoel Gomes. P2 – Arroio Pedregulho. P3 – Córrego Arquimedes.

308

309 *3.4 Caracterização das variáveis biométricas*

310 Em cada uma das localidades em estudo, foi possível verificar que os animais
 311 coletados apresentaram valores semelhantes quanto ao comprimento total, comprimento
 312 padrão, peso total, peso das vísceras e peso das gônadas (Tabela 4). Apenas os exemplares
 313 coletados no rio Manoel Gomes, na estação de Inverno ($1,65 \pm 0,83$ g), apresentaram pesos
 314 das gônadas significativamente maiores do que os exemplares coletados no Outono
 315 ($0,27 \pm 0,30$ g) ($W=4$; $p=0,0007$).

316

317 **Tabela 4**318 Médias e Desvios-Padrão das variáveis biométricas de *R. branneri*.

	Rio Manoel Gomes		Arroio Pedregulho		Córrego Arquimedes		p
	Outono	Inverno	Outono	Inverno	Outono	Inverno	
CT (cm)	13,7 \pm 3,65	12,4 \pm 3,03	14,1 \pm 4,77	16,4 \pm 1,62	12,0 \pm 4,24	9,8 \pm 3,31	> 0,05
CP (cm)	11,4 \pm 3,00	10,4 \pm 2,60	10,8 \pm 3,71	13,8 \pm 1,34	10,1 \pm 3,67	8,3 \pm 2,74	> 0,05
PT (g)	27,1 \pm 23,72	23,0 \pm 14,24	29,8 \pm 27,59	43,2 \pm 16,62	18,6 \pm 17,54	12,0 \pm 14,32	> 0,05
PV (g)	2,5 \pm 2,40	3,6 \pm 2,20	3,4 \pm 3,23	7,1 \pm 5,58	2,3 \pm 2,88	1,5 \pm 2,07	> 0,05
PG (g)	0,3 \pm 0,30	1,6 \pm 0,83*	0,4 \pm 0,55	3,3 \pm 3,77	0,6 \pm 0,38	0,9 \pm 1,35	0,000 7
n	13	10	7	2	15	15	62

319 CT: Comprimento total; CP: Comprimento padrão; PT: Peso total; PV: Peso visceral; PG: Peso gonadal.

320 * $p < 0,05$ no teste Mann-Whitney-U.

321

322 *3.5 Análise enzimática da neurotoxicidade e estresse oxidativo de R. branneri*

323 **Ponto 1 – rio Manoel Gomes:** no outono, houve uma baixa atividade da ChE tanto do
 324 cérebro ($t=-7,73$, $p=0,0001$) quanto do músculo ($W=3$, $p < 0,0001$). No músculo também
 325 foi observado baixa atividade da GR ($W=11$, $p=0,0068$), altos níveis de LPO ($W=4$,
 326 $p=0,00075$) e da atividade da SOD ($t=5,53$, $p < 0,001$). Já a atividade da catalase ($W=43$,
 327 $p=0,53$) e da GST ($W=58$, $p=0,12$) não apresentaram diferença significativa entre as
 328 estações (Fig. 3).

329 **Ponto 2 – Arroio Pedregulho:** houve diminuição significativa na atividade
330 colinesterásica muscular no outono ($W=3$, $p<0,001$). Não houve diferença significativa
331 para a ChE do cérebro ($W=0$, $p=0,055$), GR ($W=2$, $p=0,8$), LPO ($W=2$, $p=0,75$), Catalase
332 ($W=4$, $p=0,5$) e GST ($W=10$, $p=0,095$) entre as estações. Vale ressaltar a significância
333 limítrofe da variável SOD ($W=14$, $p=0,055$) (Fig. 3).

334 **Ponto 3 – Córrego Arquimedes:** no outono houve baixa atividade da ChE para cérebro
335 ($t=-4,73$, $p=0,0002$) e músculo ($t=-6,345$, $df=25$, $p<0,001$) e também da atividade da GR
336 ($W=4$, $p=0,00068$), e alta atividade da SOD ($t=16,237$, $df=14,291$, $p<0,001$). As análises
337 de LPO, Catalase e GST não apresentaram diferenças significativas entre as estações
338 ($W=36$, $p=0,80$; $W=81,5$, $p=0,47$; $t=1,08$, $df=21$, $p=0,29$ respectivamente) (Fig. 3).

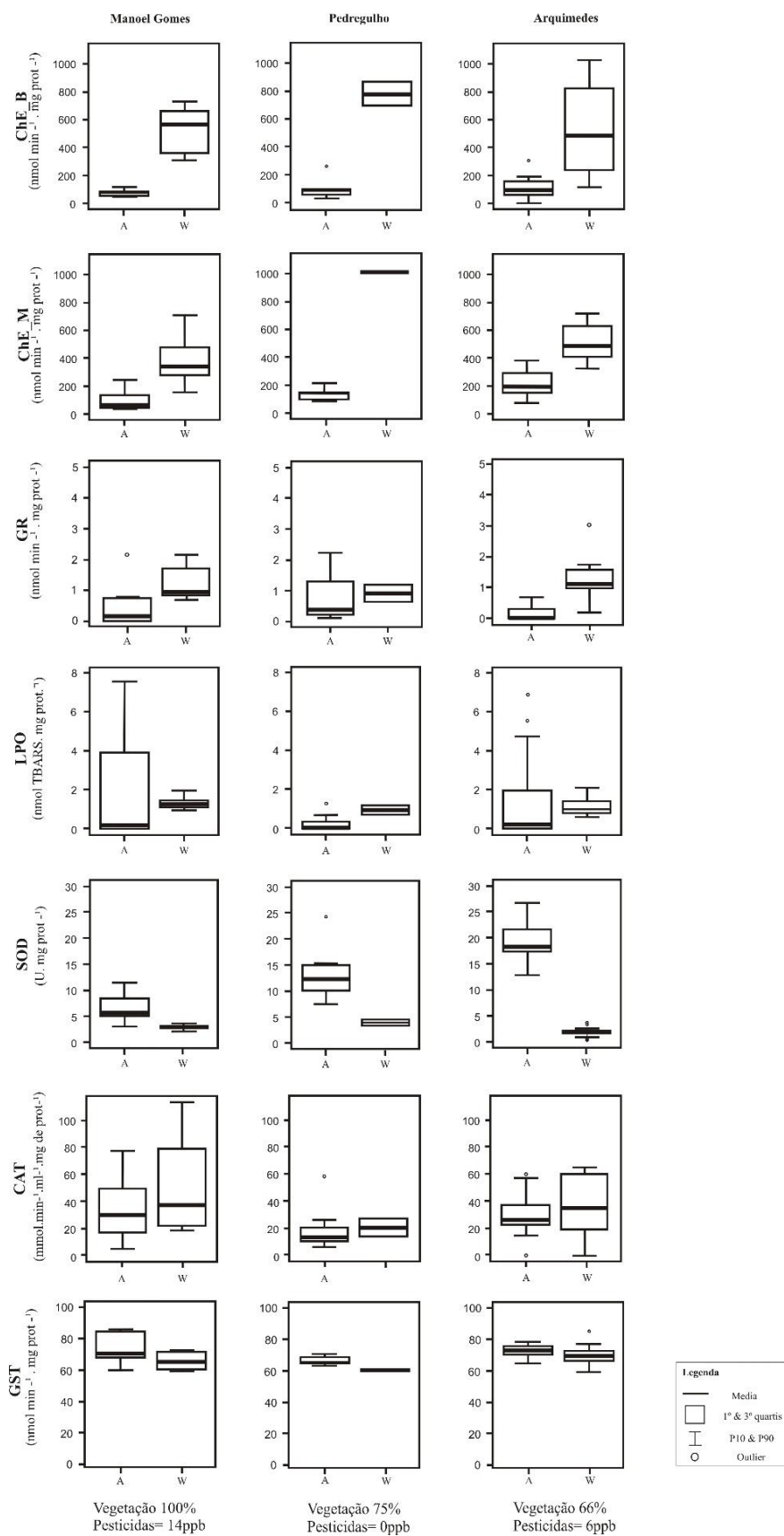
339

340 Por meio da análise multivariada, foi verificada a associação entre os
341 biomarcadores e os locais nas estações de Inverno e Outono a partir da interpretação dos
342 componentes principais. Nesta análise são definidas cargas fatoriais, as quais são
343 correlações de cada variável com componente principal, sendo este uma nova variável
344 definida pelo conjunto destas associações.

345 O primeiro componente principal foi definido como a variação dos Biomarcadores
346 em função das Estações do Ano (Autovalor=2,71; Variabilidade=30%). Os escores
347 negativos do primeiro componente principal representam os valores obtidos no Outono,
348 sendo que a reação de LPO e a atividade da SOD e GST foram mais elevados, enquanto
349 os valores de ChE, tanto do cérebro quanto do músculo, foram mais baixos em todos os
350 pontos de coleta. Vale ressaltar que a atividade da GR foi menor para o rio Manoel Gomes
351 e para o córrego Arquimedes. Os escores positivos representam os valores observados no
352 Inverno, sendo, portanto, um cenário oposto ao observado no outono (Tabela 5 e Fig.4).

353 O segundo componente principal representa a associação com ocorrência de
354 Pesticidas (Autovalor=2,17; Variabilidade=24%). Pode-se notar que o rio Manoel Gomes
355 apresentou forte associação com valores altos de pesticida, sendo o local com maior % de
356 vegetação em suas margens (Fig. 4).

357



358

359

360

361

362

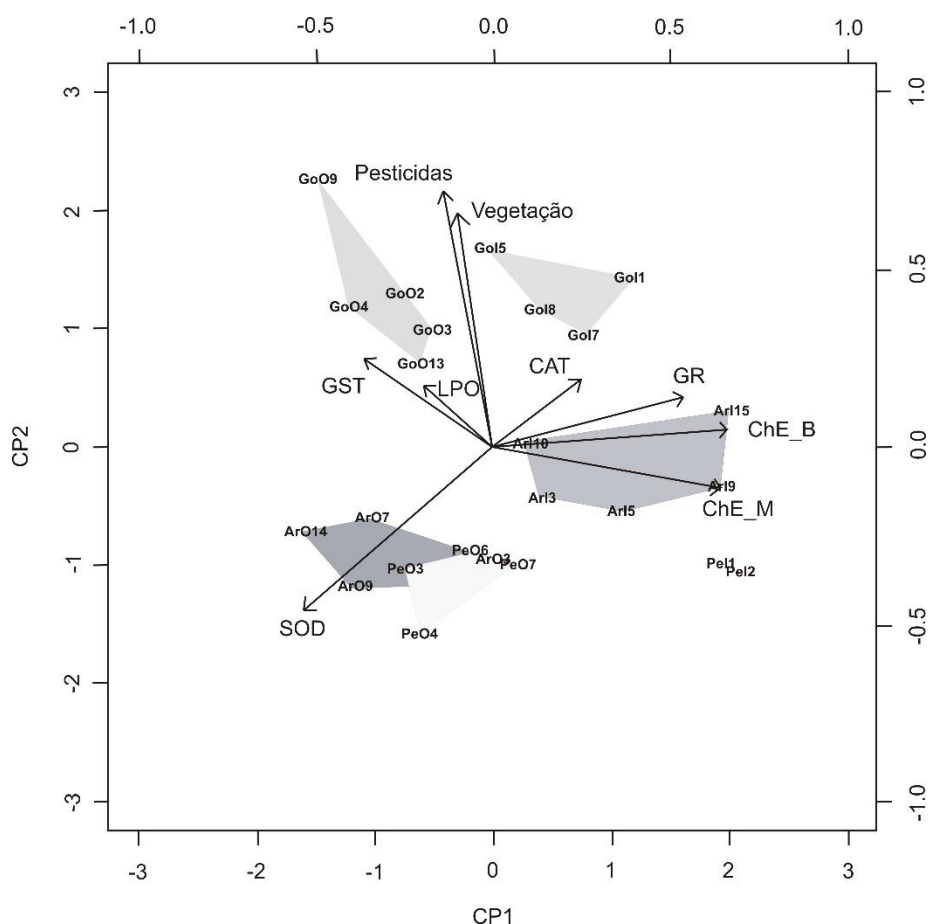
Fig. 3. Box plots dos biomarcadores avaliados no rio Manoel Gomes, Arroio Pedregulho e Córrego Arquimedes. A) Colinesterase Cerebral; B) Colinesterase Muscular; C) Glutationa Redutase; D) Lipoperoxidação; E) Superóxido Dismutase; F) Catalase; G) Glutationa Transferase.

363 **Tabela 5**
 364 Autovalores e variâncias acumuladas para cada eixo, e respectivas cargas fatoriais.

	CP1	CP2
LPO	-0.25	0.22
CAT	0.31	0.24
ChE_C	0.83	0.06
ChE_M	0.82	-0.15
SOD	-0.68	-0.57
GST	-0.46	0.31
GR	0.67	0.18
Pesticidas	-0.18	0.91
Vegetação	-0.17	0.87
Autovalor	2,71	2,17
% variância acumulada	30%	54%

365 *As variáveis que foram mais importantes para a interpretação estão destacadas em negrito*

366

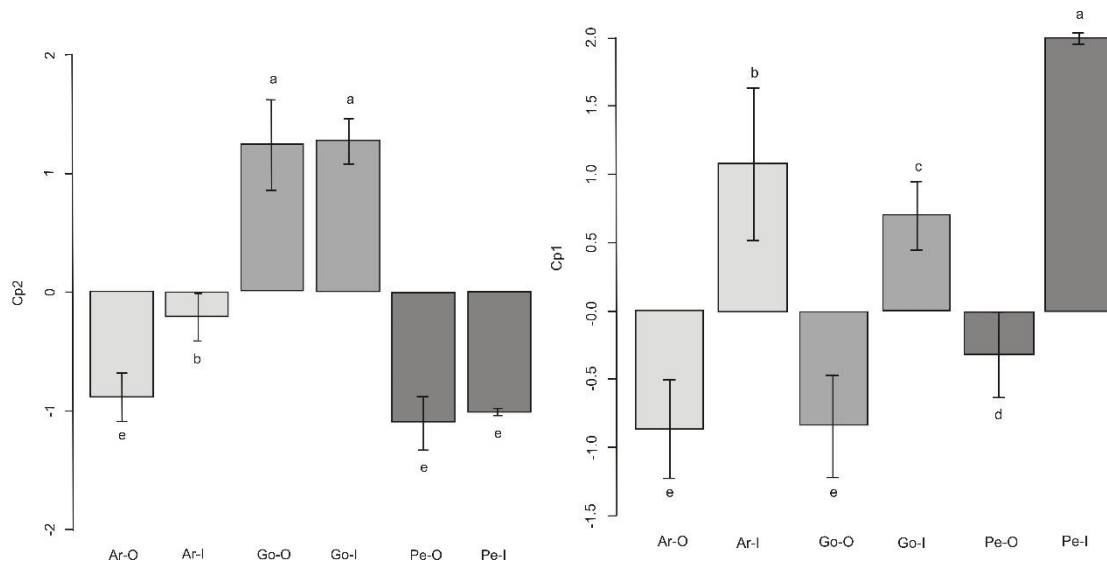


367

368 **Fig. 4.** Diagrama de Ordenação das variáveis bióticas (biomarcadores) e abióticas
 369 (Vegetação e Pesticida) derivadas da análise de componentes principais. LPO –
 370 Lipoperoxidação; CAT – Catalase; ChE_C – Colinesterase cerebral; ChE_M –
 371 Colinesterase muscular; SOD – Superóxido Dismutase. Go – rio Manoel Gomes; Pe –
 372 Arroio Pedregulho; Ar – Córrego Arquimedes. O – Outono; I – Inverno.

373 As cargas fatoriais do componente principal 1, que representa as variações dos
 374 biomarcadores em função das estações, apresentaram diferenças significativas para as
 375 estações ($F=286,0$; $p<0,0001$) e para os locais ($F=6,238$; $p=0,004$), não havendo interação
 376 entre local e estação ($F=2,701$; $p=0,076$) (Fig. 5A). As cargas fatoriais do componente
 377 principal 2, que representam a distribuição de pesticidas, apresentaram diferenças
 378 significativas para as estações ($F=32,01$; $p<0,0001$), entre os locais ($F=405,54$; $p<0,0001$)
 379 e a interação entre local e estação ($F=10,91$; $p=0,0001$) (Fig. 5B).

380



382

383 **Fig. 5.** Médias e Desvios Padrão das cargas fatoriais do primeiro e segundo componente
 384 principal. Letras indicam diferenças estatísticas entre as localidades avaliadas nas
 385 respectivas estações (LSD-Fisher; $p<0,05$).

386

387

388 4. Discussão

389

390

Nas amostras de solo analisadas foram encontrados os organofosforados
 391 Disulfoton, Metil Paration, Ronnel Fenclorfos. O Disulfoton ($C_8H_{19}O_2PS_3$) é um
 392 organofosforado de elevada toxicidade, seu efeito residual é longo, comparado a outros
 393 organofosforados, agindo cerca de 40 dias (Nakano et al., 1992). O Metil Paration
 394 ($C_8H_{10}NO_5PS$) é um dos inseticidas mais antigos, sendo instável em meio alcalino
 395 (Nakano et al., 1992). Dentro da classificação toxicológica de acordo com a Portaria da
 396 Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) nº10 de 1985, está enquadrado como
 397 muito tóxico (Ferreira et al., 2010) (Ferreira et al., 2010). Já o Ronnel Fenclorfos
 398 ($C_8H_8Cl_3O_3PS$) tem sido utilizado para controlar artrópodes ecto e endoparasitas,
 399 apresentando risco semelhante a todos os demais organofosforados (PubChem, 2016).

400 Foi evidenciado que os meses de março e abril apresentaram maior área de plantio.
401 A realização de controle químico contra pragas vegetais depende de uma série de
402 características do próprio patógeno, como por exemplo, pico populacional de adultos
403 (Silveira-Neto et al., 1992) e abundância por área de plantio (EMBRAPA, 2005).
404 Contudo, é fato que a partir do momento do plantio e desenvolvimento do cultivar, se
405 inicia a aplicação de agroquímicos.

406 Os três riachos avaliados apresentaram diferenças quanto as características físicas
407 e químicas. Enquanto o rio Manoel Gomes está localizado em uma Unidade de
408 Conservação, contendo 100% de área vegetal no entorno de sua microbacia, também foi
409 o riacho com maior concentração de agrotóxicos em seu sedimento (14 ppb). O arroio
410 Pedregulho também está em uma Unidade de Conservação (RPPN), com 75% de área
411 vegetal no entorno de sua microbacia, porém sem a detecção de pesticidas. Por fim, o
412 córrego Arquimedes apresenta a menor área de vegetação em sua microbacia (66%), com
413 a detecção de 6,31 ppb de Metil Paration. Estas observações, bem como as características
414 de aplicação de agrotóxicos nos períodos estudados serão a base de argumentação para
415 os resultados encontrados no presente estudo.

416 Dentre os biomarcadores avaliados, foi possível verificar menor atividade
417 colinesterásica, tanto no cérebro quanto no músculo, durante o outono em todos os locais
418 de coleta. O fato de apresentar baixos níveis da atividade das enzimas colinesterases,
419 independentemente da estrutura dos locais, pode estar relacionado à contaminação
420 provinda da aplicação de pesticidas nos arredores dos locais em estudo, a qual se dá
421 principalmente nos meses de março e abril (Outono). Por meio da lixiviação no solo, estes
422 agrotóxicos podem atingir o leito de riachos, promovendo a reação de inibição de
423 atividade enzimática das colinesterases em organismos não alvo (Fonseca et al., 2008;
424 Nakano et al., 1992; Pessoa et al., 2011; Silva et al., 2013; Sturm et al., 1999). Pesquisas
425 demonstraram resultados de inibição da atividade das enzimas colinesterásicas em
426 espécies de jundiás (Cattaneo et al., 2008; Crestani et al., 2007), assim como em
427 *Prochilodus lineatus* expostos a água de rios com maiores níveis de pesticidas (Vieira et
428 al., 2016).

429 Ainda no período de Outono, os animais coletados no rio Manoel Gomes
430 apresentaram maior atividade de reação de lipoperoxidação, fato que não foi observado
431 nos demais riachos. Uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio atinge os
432 lipídeos celulares promovendo a reação de lipoperoxidação. O radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), por
433 exemplo, pode ser gerado fora da membrana e atuar sobre os carboidratos e as proteínas

434 extrínsecas (ex. glicoproteínas da superfície de membrana), bem como nas porções
435 polares fosfolipídicas. A partir do início da lipoperoxidação ocorre uma reação em cadeia
436 de radicais livres. Certamente este dano oxidativo no glicocálix pode afetar a função
437 celular e contribuir com inúmeras patologias (Halliwell, Gutteridge, 2015).

438 Inúmeros são os registros de lipoperoxidação causado pela contaminação por
439 agrotóxicos. Jundiás expostos aos herbicidas glifosato (Menezes et al., 2011a) e
440 Clomazone (Menezes et al., 2011b) tiveram os níveis de TBARS aumentados, tanto no
441 músculo quanto no fígado, assim como àqueles expostos ao Metil Paration (Ferreira et
442 al., 2010; Isik and Celik, 2008; Monteiro, 2006) e Tebuconazole (Ferreira, 2010). Bueno-
443 krawczyk et al. (2015) e Vieira et al. (2016) alegaram que o aumento das reações de
444 lipoperoxidação está associado a contaminação com pesticidas em ambientes rurais, o
445 que também é observado no presente estudo.

446 No rio Manoel Gomes e no córrego Arquimedes, a atividade da SOD apresentou
447 valores elevados durante os meses de Outono. Ressalta-se que no arroio Pedregulho
448 também foi evidenciado tal fato, porém com significância limítrofe ($p < 0,10$). A enzima
449 SOD apresenta papel fundamental no sistema antioxidante, uma vez que realiza a
450 dismutação sobre a espécie reativa ao oxigênio superóxido. O peróxido resultante desta
451 reação pode desencadear inúmeras outras reações, como por exemplo a ação da enzima
452 catalase e da glutathione peroxidase, as quais realizam a transformação de H_2O_2 em água
453 e oxigênio (Halliwell and Gutteridge, 2015).

454 Duas questões podem estar relacionadas aos resultados encontrados: a indução da
455 SOD pela presença de agrotóxicos e outros poluentes ambientais, ou indução pela
456 variação da temperatura da água. Existem registros bastante variados da ação de
457 agroquímicos sobre a atividade da SOD. Em *Oncorhynchus mykiss*, Paration Metílico não
458 altera a atividade da SOD muscular, enquanto o organofosforado Diazinon causa
459 oscilação na atividade desta enzima (Isik e Celik, 2008). Em *Brycon cephalus*, Paration
460 Metílico elevou a atividade da SOD (Monteiro, 2006) e em *Rhamdia quelen*, o glifosato
461 não demonstrou influenciar a SOD muscular (Menezes et al., 2011a). Em situações com
462 temperaturas mais elevadas observa-se aceleração do sistema de defesa antioxidante
463 enzimática, elevando-se a atividade da SOD para a espécie *Oryzias latipes* quando
464 acondicionado a 30°C (Hemmer-Brepson et al., 2014), para *Heteropneustes fossilis* a
465 37°C (Prakash et al., 1998) e para *Pimephales promelas* a 25°C (Clotfelter et al., 2013).
466 Porém, Radovanović et al. (2010) demonstraram que houve aumento da atividade da SOD
467 em temperaturas mais amenas de primavera quando comparadas às temperaturas de verão

468 para a espécie de peixe *Barbus barbus*. O estresse promovido por temperaturas mais
469 elevadas pode inibir a atividade da enzima, sendo a temperatura de inibição enzimática é
470 uma característica intrínseca de cada espécie (Bueno-krawczyk et al., 2015; Pavlović et
471 al., 2013).

472 A enzima GR apresentou menor atividade nos rios Manoel Gomes e córrego
473 Arquimedes nos meses de Outono. Esta enzima atua na redução de glutathiona oxidada
474 (GSSG) a glutathiona reduzida (GSH) às custas da presença de NADPH (van der Oost et
475 al., 2003). A inibição da GR na presença de agrotóxicos é fato já relatado na literatura
476 (Ballesteros et al., 2009; Zhang et al., 2004). Estas respostas inibitórias podem ser
477 resultado do *feedback* negativo promovido pelo aumento de GSH (Tekman et al., 2008)
478 ou ainda, pode ocorrer a inibição de sua atividade pela presença de aldeídos endógenos,
479 resultantes da peroxidação lipídica, potencializando o dano oxidativo já em processo
480 (Vander Jagt et al., 1997).

481 Apesar da atividade da catalase e GST não apresentarem diferenças significativa
482 neste trabalho, na análise de componentes principais observa-se que há valores
483 diminuídos para a catalase e aumentados para GST. Em relação a catalase, situação
484 semelhante foi relatado por Zhang et al. (2004), quando observou indução da atividade
485 da SOD e inibição da catalase. Este fato pode ser decorrência dos elevados valores de
486 H₂O₂ resultantes da dismutação do superóxido, que conseqüentemente levam a inibição
487 da CAT (Kono and Fridovich, 1982); a reação de degradação de H₂O₂ pode,
488 primeiramente, ser desempenhada pela GPx, ou ainda ser inibida por ação direta de algum
489 xenobiótico (Arbo et al., 2006). Já a GST está relacionada com a defesa do DNA e
490 lipídios, bem como com a catálise da conjugação dos compostos eletrofilicos com a GSH
491 (van der Oost et al., 2003). Esta enzima pode ser inibida por xenobióticos durante o
492 processo detoxificação, devido a sua interação com estes compostos durante processo de
493 conjugação da GSH por ela catalisado (Al-Ghais e Ali, 1999; Frasco e Guilhermino,
494 2002).

495 O sistema antioxidante funciona em uma reação em cadeia que pode ser induzido
496 como uma resposta compensatória a um pequeno estresse, como também pode ter a
497 atividade das enzimas suprimidas por um severo estresse, em função dos danos e perdas
498 do mecanismo compensatório (Zhang et al., 2004). No presente estudo, foram observados
499 elevados valores para LPO e SOD concomitantes à inibição da GR em períodos de
500 Outono, quando há alta aplicação de pesticidas e no rio Manoel Gomes, onde foram
501 detectadas as maiores concentrações de pesticidas no sedimento.

502 O conhecimento das relações entre as diferentes vias do sistema antioxidante
503 enzimático pode auxiliar na explicação dos resultados encontrados. O influxo de
504 compostos geradores de superóxido, assim como outras espécies reativas podem estar
505 relacionadas a estes resultados, atuando em diferentes pontos do equilíbrio do
506 metabolismo oxidante/antioxidante. Altos níveis de superóxidos induzem a atividade da
507 SOD gerando peróxido de hidrogênio, que em altas concentrações poderiam impedir o
508 aumento concomitante da atividade catalase. O alto nível de LPO, pode atuar na geração
509 de 4-hidroxinonenal, modificando os resíduos redox-ativo de cisteína que participam no
510 sítio catalítico da GR (Vander Jagt et al., 1997) explicando, por sua vez, os baixos níveis
511 de atividade da GR.

512 Observando a resposta dos biomarcadores apresentadas neste trabalho,
513 verificamos que, apesar de haver forte indicação da alteração da SOD estar relacionada à
514 variação temporal (SOD), a resposta dos demais biomarcadores (ChE Muscular, ChE
515 Cerebral, LPO) demonstram forte evidência da interação do período de coleta com à
516 exposição desses animais à compostos agroquímicos.

517

518 **5. Conclusão**

519

520 As análises de biomarcadores de estresse oxidativo e de efeitos neurotóxicos
521 demonstraram que exemplares de *Rhamdia branneri*, espécie considerada endêmica para
522 a bacia do baixo rio Iguaçu, apresentaram diferentes comportamentos em função das
523 estações do ano, apresentando evidências de estarem em contato com agentes oxidantes
524 e anticolinesterásicos, principalmente no Outono. Apesar dos riachos estarem localizados
525 em regiões com ampla vegetação circundante e em áreas de proteção ambiental, as
526 análises de solo mostram que resíduos de pesticidas ainda assim atingem estas
527 localidades.

528 Uma vez que uma espécie bioindicadora apresenta alterações em seu sistema
529 antioxidante, bem como efeitos de neurotoxicidade, em função da sazonalidade e da
530 presença de agroquímicos em regiões com vegetação amplamente preservada, tais
531 resultados alertam para se ter atenção redobrada no sentido de fiscalização de uso de
532 produtos químicos em regiões próximas a áreas de preservação ambiental.

533

534

535

536 **Agradecimentos**

537 À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
538 CAPES.

539

540 **Referências**

541

542 Abucarma, M., Martins-Santos, I.C., 2001. Karyotype and B Chromosome of *Rhamdia*
543 *Species* (Pisces, Pimelodidae) Endemic in the River Iguacu Basin. *Cytologia*
544 (Tokyo). 66, 299–306.

545 Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.

546 doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3

547 Al-Ghais, S.M., Ali, B., 1999. Inhibition of Glutathione S-Transferase Catalyzed
548 Xenobiotic Detoxication by Organotin Compounds in Tropical Marine Fish
549 Tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 207–213.

550 Allan, J.D., Castillo, M.M., 2007. *Stream ecology: structure and function of running*
551 *waters*, 3^a. ed. Springer Science & Business Media, Dordrecht.

552 ANVISA, 2014. Relatório Complementar Relativo À Segunda Etapa Das Análises De
553 Amostras Coletadas Em 2012. Brasília.

554 APHA, A.P.H.A., 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and*
555 *Wastewater*. doi:ISBN 9780875532356

556 Arbo, M.D., Ludwig, L.S., Alano, A.S., Zardo, V., Steffen, V.M., 2006. Efeito tóxico
557 dos praguicidas maneb e paraquat sobre a atividade da enzima antioxidante
558 catalase em ratos. *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.* 27, 57–61. doi:ISSN 1808-
559 4532

560 Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009. Oxidative stress responses in
561 different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan 72, 199–205.

562 doi:10.1016/j.ecoenv.2008.01.008

563 Baumgartner, G., Pavanelli, C.S., Baumgartner, D., Gasparetto, A., Debona, T., Frana,
564 V.A., 2012. Peixes do baixo rio Iguacu. Eduem, Maringá.

565 Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of
566 Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
567 *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

568 Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 52,
569 302–310.

570 Bueno-krawczyk, A.C.D., Guiloski, I.C., Piancini, L.D.S., Azevedo, J.C., Ramsdorf,
571 W.A., Ide, A.H., Guimarães, A.T.B., Cestari, M.M., Assis, H.C.S. De, 2015.

572 Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply.

573 *Chemosphere* 135, 257–264. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.04.064

574 Carneiro, F.F., Rigotto, R.M., Augusto, L.G.S., Friedrich, K., Burigo, A.C., 2015.

575 Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde,
576 Associação Brasileira de Saúde Coletiva - ABRASCO. doi:10.1016/B978-84-458-
577 2066-7.00003-3

578 Cattaneo, R., Loro, V., L., Spanevello, R., Silveira, F.A., Luz, L., Miron, D.S., Fonseca,
579 M.B., Moraes, B., S., Clasen, B., 2008. Metabolic and histological parameters of

580 silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-
581 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92, 133–
582 137. doi:10.1016/j.pestbp.2008.07.004

583 Chaim, A., 2004. *Tecnologia de Aplicação de Agrotóxicos: Fatores que afetam a*

- 584 eficiência e o impacto ambiental. Embrapa, pp. 289–317.
- 585 Clotfelter, E.D., Lapidus, S.J.H., Brown, A.C., 2013. The effects of temperature and
586 dissolved oxygen on antioxidant defences and oxidative damage in the fathead
587 minnow *Pimephales promelas*. *J. Fish Biol.* 82, 1086–1092. doi:10.1111/jfb.12050
- 588 Conama, 2005. Resolução n 357. Diário Of.
- 589 Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Santos Miron, D. dos, Spanevello, R., Silveira,
590 A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide
591 on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and
592 recovery pattern. *Chemosphere* 67, 2305–2311.
593 doi:10.1016/j.chemosphere.2006.09.070
- 594 Crouch, R.K., Gandy, S.E., Kimsey, G., Galbraith, R.A., Galbraith, G.M.P., Buse,
595 M.G., 1981. The Inhibition of Islet Superoxide Dismutase by Diabetogenic Drugs.
596 *Diabetes* 30, 235–241.
- 597 El-Aal, H.A.H.M., 2012. Lipid Peroxidation end-Products as a key of oxidative stress :
598 effect of antioxidant on their production and transfer of free radicals, in: *InTech*.
599 pp. 64–88. doi:http://dx.doi.org/10.5772/45944
- 600 Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid
601 colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*
602 7, 88–95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- 603 EMBRAPA, 2005. Relatório de Gestão. Brasília. doi:ISSN 1679-4680
- 604 Fernandes, V.C., Domingues, V.F., Mateus, N., Delerue-Matos, C., 2012. Multiresidue
605 pesticides analysis in soils using modified QuEChERS with disposable pipette
606 extraction and dispersive solid-phase extraction. *J. Sep. Sci.* 36, 376–382.
607 doi:10.1002/jssc.201200673
- 608 Ferreira, D., Motta, A.C. d, Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010.
609 Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals.
610 *Chemosphere* 79, 914–921. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.024
- 611 Fonseca, M.B., Gluszczak, L., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A.,
612 Zanella, R., Gonçalves, F.F., Loro, V.L., 2008. The 2, 4-D herbicide effects on
613 acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish
614 (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 416–420.
615 doi:10.1016/j.ecoenv.2007.08.006
- 616 Frasco, M.F., Guilhermino, L., 2002. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on
617 selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 149–156.
618 doi:10.1023/A:1025457831923
- 619 Freire, M.M., Santos, V.G., Ginuino, I.S.F., Arias, A.R.L., 2008. Biomarcadores Na
620 Avaliação Da Saúde Ambiental Dos Ecossistemas Aquáticos. *Oecologia Bras.* 12,
621 347–354. doi:10.4257/oeco.2008.1203.01
- 622 Habig, H., Pabst, J., Jakoby, B., 1976. Glutathione AA from Rat Liver The glutathione.
623 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free radicals in Biology and Medicine*, 5^a. ed.
624 Oxford University Press.
- 625 Hemmer-Brepson, C., Replumaz, L., Romestaing, C., Voituron, Y., Daufresne, M.,
626 2014. Non-stressful temperature effect on oxidative balance and life history traits
627 in adult fish (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Biol.* 217, 274–282. doi:10.1242/jeb.096172
- 628 IBGE, I.B.D.G.E.E., 2016. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola- Pesquisa
629 Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil.
630 *Levant. Sist. da Produção Agrícola* 29, 1–79. doi:ISSN 0103-443X
- 631 ICMBio, I.C.M., 2016. Plano de Manejo do Parque Nacional do Iguaçu [WWW
632 Document]. URL
633 http://www.cataratasdoiguacu.com.br/manejo/siuc/planos_de_manejo/pni/html/ind

- 634 ex.htm. (accessed 8.3.16).
- 635 Isik, I., Celik, I., 2008. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for
636 oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout
637 (*Oncorhynchus mykiss*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 92, 38–42.
638 doi:10.1016/j.pestbp.2008.06.001
- 639 Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257,
640 5751–4.
- 641 Korkmaz, S., Goksuluk, D., Zararsiz, G., 2014. MVN: An R Package for Assessing
642 Multivariate Normality.
- 643 Lushchak, O. V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low
644 toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues.
645 *Chemosphere* 76, 932–937. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.04.045
- 646 Mendiburu, F., 2016. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.*
- 647 Menezes, C.C., Fonseca, M.B., Loro, V.L., Santi, A., Cattaneo, R., Clasen, B., Pretto,
648 A., Morsch, V.M., 2011a. Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and
649 Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 665–
650 671. doi:10.1007/s00244-010-9574-6
- 651 Menezes, C.C., Loro, V.L., Fonseca, M.B., Cattaneo, R., Pretto, A., Miron, D. dos S.,
652 Santi, A., 2011b. Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to
653 commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. *Pestic.*
654 *Biochem. Physiol.* 100, 145–150. doi:10.1016/j.pestbp.2011.03.002
- 655 Mise, F.T., Tencatt, L.F.C., Souza, F., 2013. Ecomorphological differences between
656 *Rhamdia* (Bleeker, 1858) populations from the Iguazu River basin. *Biota Neotrop.*
657 13, 99–104. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032013000400010
- 658 Monteiro, D.A., 2006. Efeitos do inseticida organofosforado Metil Paration (Flisuper
659 600 BR) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce
660 matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) e o papel da suplementação de selênio
661 na dieta (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- 662 Nakano, O., Batista, C.G., SilveiraNeto, S., 1992. Controle Químico, in: *Curso de*
663 *Entomologia Aplicada À Agricultura.* FEALQ., pp. 159–196.
- 664 Pavlović, S., Borković-mitić, S., Gavrilović, B., Despotović, S.G., Gavrić, J.P., Saičić,
665 Z.S., 2013. Seasonal Changes of Oxidative Stress Biomarkers in White Muscle of
666 Longfin Gurnard (*Chelidonychthys obscurus*) from the Adriatic Sea. *Water Res.*
667 *Manag.* 3, 19–25.
- 668 Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B.,
669 Nogueira, A.J., Bairy, A.C.D., Carvalho, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition
670 and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages.
671 *Aquat. Toxicol.* 105, 312–320. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.020
- 672 Prakash, P., Kumar, G.P., Laloraya, M., Hemnani, T., Parihar, M.S., 1998. Superoxide
673 anion radical generation as a temperature stress response in the gills of freshwater
674 catfish *Heteroeneustes fossilis*: Role in mucus exudation under elevated
675 temperature. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119,
676 211–216. doi:10.1016/S0742-8413(97)00209-0
- 677 PubChem, 2016. The PubChem Project. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
678 (accessed 8.3.16).
- 679 Radovanović, T.B., Mitić, S.S.B., Perendija, B.R., Despotović, S.G., Pavlović, S.Z.,
680 Cakić, P.D., Saičić, Z.S., 2010. Superoxide dismutase and catalase activities in the
681 liver and muscle of barbel (*Barbus Barbus*) and its intestinal parasite
682 (*Pomphorynchus laevis*) from the danube river, serbia. *Arch. Biol. Sci.* 62, 97–

- 683 106. doi:10.2298/ABS1001097R
684 Resende, Á.V., 2002. Agricultura e qualidade da Água : Contaminação da Água por
685 Nitrato. Planaltina.
686 Revelle, W., 2015. Psych: Procedures for Personality and Psychological Research.
687 SEAB, S. da A. e do A., 2016. PSS. URL
688 www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/pss.xls. (accessed 5.9.16).
689 Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary Glutathione
690 Disulfide release in chronically ethanol-treated rats. FEBS Lett. 103, 287–290.
691 doi:10.1016/0014-5793(79)81346-0
692 Silva, M.R. da, Campos, A.C.E. de, Bohm, F.Z., 2013. Agrotóxicos E Seus Impactos
693 Sobre Ecossistemas Aquáticos Continentais. SaBios-Revista Saúde e Biol. 8, 46–
694 58.
695 Silva de Assis, H.C., 1998. Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung
696 vom gewässerverschmutzungen. (Ph.D. thesis). University of Berlin, Berlin.
697 Silveira-Neto, S., Marchini, L.C., Alves, S.B., 1992. Pragas das pastagens, in: Curso de
698 Entomologia Aplicada À Agricultura. FEALQ., Piracicaba, pp. 335–353.
699 Sturm, A., Silva, H.C., Assis, D., Hansen, P., 1999. Cholinesterases of marine teleost ®
700 sh : enzymological characterization and potential use in the monitoring of
701 neurotoxic contamination 47, 389–398.
702 Team, C., 2015. R: A language and environment for statistical computing.
703 Tekman, B., Ozdemir, H., Senturk, M., Ciftci, M., 2008. Comparative Biochemistry and
704 Physiology , Part C Puri fi cation and characterization of glutathione reductase
705 from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal
706 ions on enzyme activity 148, 117–121. doi:10.1016/j.cbpc.2008.04.005
707 UFPR, O. de uso de agrotóxicos e consequências para a saúde humana e ambiental no
708 P., 2015. Vendas de defensivos agrícolas por estado e classes – 2012/14 [WWW
709 Document].
710 van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and
711 biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol.
712 Pharmacol. 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6
713 Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Vander Jagt, T.J., Gomez, M.S., Gonzales, D.M.,
714 Deck, L.M., Royer, R.E., 1997. Inactivation of glutathione reductase by 4-
715 hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. Biochem. Pharmacol. 53, 1133–
716 1140. doi:10.1016/S0006-2952(97)00090-7
717 Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Lunardelli, B., Oliveira, L.F., Cabrera, L. da C., Risso,
718 W.E., Primel, E.G., Meletti, P.C., Fillmann, G., Martinez, C.B. dos R., 2016.
719 Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in
720 situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. Sci. Total
721 Environ. 542, 44–56. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.071
722 Zhang, J., Shen, H., Wang, X., 2004. Effects of chronic exposure of 2 , 4-
723 dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius*
724 *auratus* 55, 167–174. doi:10.1016/j.chemosphere.2003.10.048
725
726