



UNILASALLE
CENTRO UNIVERSITÁRIO LA SALLE



SIMONE DE SOUZA BORGES REMPEL

**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM JUNDIÁS
(*RHAMDIA QUELEN*) EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS E AO ESTRESSE**

CANOAS, 2014

SIMONE DE SOUZA BORGES REMPEL

**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM JUNDIÁS
(*RHAMDIA QUELEN*) EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS E AO ESTRESSE**

Dissertação apresentada para a banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle - UNILASALLE como exigência para a obtenção do título de Mestre em Avaliação de Impactos Ambientais.

Orientadora: Prof^a. Dra. Alessandra Marqueze

CANOAS, 2014

SIMONE DE SOUZA BORGES REMPEL

**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM JUNDIÁS
(*RHAMDIA QUELEN*) EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS E AO ESTRESSE**

Dissertação apresentada para a banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle - UNILASALLE como exigência para a obtenção do título de Mestre em Avaliação de Impactos Ambientais.

Aprovado pela banca examinadora em 26 de março de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Alessandra Marqueze
UNILASALLE

Prof^a. Dr^a. Juliana Gomes
UNILASALLE

Prof. Dr. Leonardo J. G. Barcellos
UPF

Prof^a. Dr^a. Vanessa Schein
UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os que participaram de alguma forma na elaboração desse trabalho.

Agradeço aos meus amores, Marcelo e Manuela, pela paciência, pelo carinho e por se envolverem, mesmo sem escolha.

Agradeço aos meus pais, Elévio e Lidia, por tudo o que me ensinam. Esse, sim, é o verdadeiro conhecimento. A ajuda de vocês é essencial para que eu siga em frente.

Agradeço a todos os meus familiares, que me incentivaram, acreditaram e deram aquele empurrãozinho na hora do desânimo. Irmão, cunhada, sogra, vocês estão no meu coração.

Agradeço à minha querida amiga Patrícia, por toda a ajuda, correção, socorros, ombro etc.

Agradeço a Luciane, por sempre estar ao meu lado, mesmo quando telefona e eu digo "não posso falar contigo agora; tenta daqui a umas duas semanas". Obrigada por me ouvir de novo.

Agradeço à gentil, solícita e sempre sorridente Rosângela. Meus dias no laboratório contigo foram ótimos. Como já te disse, é uma diversão trabalhar contigo. Obrigada mesmo.

Finalmente, agradeço a minha orientadora, Alessandra, que me surpreendeu. Sempre, sem exceção, respondeu aos meus telefonemas, e-mails, ataque de nervos, e sempre soube colocar sua opinião, ideia e conhecimento, sem se impor. Ela me acalmou, me incentivou e verdadeiramente me orientou. Muito obrigada! Nossa convivência me proporcionou ensinamentos que vão além do acadêmico.

Agradeço por todas as dificuldades que enfrentei. Não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

RESUMO

A contaminação de rios, córregos e açudes por agroquímicos derivados de práticas agrícolas é um problema bastante importante. Atualmente, o Glifosato (Roundup®) é o principal herbicida utilizado no mundo. Organofosforado altamente solúvel em água usado em diversas culturas, e também em uso doméstico, está inserido na classe de baixa toxicidade. O Herbimix (simazina+atrazina), considerado de classificação toxicológica IV (pouco tóxico), também é bastante utilizado, especialmente em culturas de milho. O jundiá (*Rhamdia quelen*), peixe nativo da América do Sul, tem se mostrado resistente a contaminantes, o que permite seu uso como bioindicador ambiental. Uma opção para avaliar a contaminação por agroquímicos é a análise de tecidos, observando-se o metabolismo basal deste animal e comparando com taxas metabólicas em níveis de estresse. Assim, o estudo teve como objetivo avaliar o impacto dos agroquímicos sobre o metabolismo de carboidratos de jundiás e o período de recuperação após exposição. A avaliação foi efetuada com dois experimentos, um para cada agroquímico, e cada experimento foi dividido em duas etapas: na primeira, os peixes foram submetidos à intoxicação aguda com 50% da DL50 por um período de 96 horas, e na segunda etapa eles foram transferidos para tanques com água limpa onde se fizeram coletas nos períodos de 45, 90 e 135 dias. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos, como glicose e lactato sanguíneo e glicogênio, nos tecidos, hepático e muscular. Os resultados encontrados mostraram comportamentos semelhantes para ambos os produtos testados: o glicogênio nos tecidos hepático e muscular tiveram um decréscimo significativo e a glicose plasmática também; já o lactato no plasma foi aumentado após exposição de 96 horas ao agroquímico, e foram suficientes 45 dias para que os valores de glicogênio fossem recuperados na maioria dos tecidos analisados, mas o lactato seguiu aumentando até os 135 dias de recuperação. Frente aos resultados encontrados no estudo, pode-se constatar que os agroquímicos interferem no metabolismo do carboidrato do jundiá nos diferentes tecidos e que um período de recuperação de 45 dias foi suficiente para restabelecer a maior parte dos parâmetros alterados.

Palavras-chave: Glifosato. Herbimix. Estresse. Jundiá. Metabolismo.

ABSTRACT

The contamination of rivers, streams and dams agrochemicals derived by practical agriculture is a very important issue. Currently Glyphosate (Roundup ®) is the main herbicide used in the world, organophosphate highly soluble in Water used in various crops, and also in domestic use, is inserted into class of low toxicity. The Herbimix (simazine + atrazine) is now also quite used especially in crops of maize, considered classification Toxicological IV (slightly toxic). The silver catfish (*Rhamdia quelen*) native fish in South America has been shown to be resistant to contaminants, allowing its use as environmental bioindicator. One option to assess contamination is through analyzes of tissues, observing the metabolism of the animals and comparing with metabolic rates in stress levels. Thus, the study aimed to assess the impact and the recovery period of agrochemicals on the carbohydrate metabolism of silver catfish. This evaluation was performed for 2 experiments, one for agrochemical, and each will be divided into two stages. At first, the fish will be subjected to acute intoxication with 50% of the LD50 for 96 hours, and in the second stage, the fish are transferred to tanks with clean water in which collections will be done in periods of 45, 90 and 135 days. Were evaluated biochemical parameters as glucose and blood lactate and glycogen liver and muscle tissues had a significant decrease and glucose plasma as well, since the plasma lactate was increased after exposure to 96h the agrochemical hours, and 45 days were enough for the values of glycogen were recovered in most tissues analyzed but followed lactate increasing to 135 days of recovery. Of the results found this study we note that interfere with the metabolism of agrochemicals silver catfish carbohydrate in different tissues and that a recovery period of 45 days was sufficient to restore most of the changed parameters.

Keywords: Glyphosate. Herbimix. Stress. Silver catfish. Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese e degradação do glicogênio, vias aeróbicas e anaeróbicas ...	15
Figura 2 – Fórmula estrutural molecular do glifosato.....	17
Figura 3 – Fórmula estrutural molecular da atrazina.....	18
Figura 4 – Fórmula estrutural molecular da simazina.....	18
Figura 5 – Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>): comprimento aproximado de 30 cm, peso aproximado 95 g.....	20
Figura 6 – Representação do experimento.....	23
Figura 7 – Tanques onde os peixes ficaram durante os períodos de recuperação.....	27
Figura 8 – Glicogênio no fígado e músculo, intoxicação aguda do glifosato.....	29
Figura 9 – Glicose e lactato no plasma, intoxicação aguda do glifosato.....	31
Figura 10 – Glicogênio no fígado e músculo, intoxicação aguda do Herbimix.....	38
Figura 11 – Glicose e lactato no plasma, intoxicação aguda do Herbimix.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração dos agroquímicos usados na intoxicação aguda.....	24
Tabela 2 – Glicogênio no fígado, períodos de recuperação ao glifosato.....	33
Tabela 3 – Glicogênio no músculo, períodos de recuperação ao glifosato.....	34
Tabela 4 – Glicose no plasma, períodos de recuperação ao glifosato.....	35
Tabela 5 – Lactato no plasma, períodos de recuperação ao glifosato.....	36
Tabela 6 – Glicogênio no fígado e músculo, períodos de recuperação ao herbimix	41
Tabela 7 – Glicose no plasma, intoxicação aguda e períodos de recuperação ao herbimix.....	42
Tabela 8 – Lactato no plasma, intoxicação aguda e períodos de recuperação ao herbimix.....	43

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AChe	Enzima acetilcolinesterase
ADAPAR	Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
ANOVA	Análise da Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEPAGRO	Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária
CL50	Concentração letal de 50% da população
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DL50	Dose letal de 50% da população
FAMV	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
LFP	Laboratório de Fisiologia de Peixe
NBR	Norma Brasileira
POEA	Polioxietileno amina
TBARS	Ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Objetivos	13
1.1.1	<i>Objetivo geral</i>	13
1.1.2	<i>Objetivos específicos</i>	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Bioindicador ambiental	14
2.2	Glicogênese, glicose e lactato	15
2.3	Interferência do estresse no metabolismo de peixe	16
2.4	Glifosato	16
2.5	Herbimix	17
2.6	O jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	19
2.7	Biotransformação	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Local	21
3.2	População experimental	21
3.3	Aspectos ambientais	21
3.4	Aspectos éticos	21
3.5	Tempo de exposição	22
3.6	Agroquímicos testados	22
3.7	Experimento	22
3.7.1	<i>Tratamentos</i>	23
3.7.2	<i>Etapa 1</i>	24
3.7.3	<i>Etapa 1- Parâmetros avaliados</i>	25
3.7.3.1	Análise do tecido.....	25
3.7.3.2	Análise do sangue.....	26
3.7.4	<i>Etapa 2</i>	26
3.8	Teste de resposta ao estresse	27
3.9	Manutenção dos tanques no período de recuperação	27
3.10	Análise estatística	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Glifosato	29
4.1.1	<i>Etapa 1 – Intoxicação aguda</i>	29

4.1.1.1	Tecidos hepático e muscular.....	29
4.1.1.2	Plasma sanguíneo.....	31
4.1.2	<i>Etapa 2 – Recuperação</i>	33
4.1.2.1	Tecidos hepático e muscular.....	33
4.1.2.2	Plasma.....	35
4.2	Herbimix	37
4.2.1	<i>Etapa 1 – Intoxicação aguda</i>	37
4.2.1.1	Tecidos hepático e muscular.....	37
4.2.1.2	Plasma.....	39
4.2.2	<i>Etapa 2 – Recuperação</i>	40
4.2.2.1	Tecido hepático e muscular.....	40
4.2.2.2	Plasma.....	42
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	45
6	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Os agroquímicos são agentes químicos utilizados na agricultura para o controle de plantas daninhas (SOUZA & FAVARO, 2012). A contaminação de rios, arroios e açudes pode ocorrer de forma direta durante a aplicação dos produtos nas lavouras e de forma indireta na drenagem de áreas alagadas, após chuvas fortes, ou, ainda, lixiviado de restos de produtos em embalagens descartadas inadequadamente (SILVA *et al.*, 2003).

O Glifosato Roundup[®], principal agroquímico utilizado nos dias atuais, representando 10% do consumo mundial, é um organofosforado altamente solúvel em água (SANCHO *et al.*, 1992). O Herbimix (simazina + atrazina), segundo a Agência de Defesa Agropecuária do Paraná - ADAPAR, é um herbicida utilizado na cultura de milho, soja e cana-de-açúcar e se mostra bastante persistente no ambiente (ADAPAR, 2013).

Peixes são bons modelos para serem usados como bioindicadores ambientais. São consumidores que se alimentam de insetos, crustáceos, vegetais e detritos orgânicos, absorvendo grande quantidade de contaminantes. O jundiá (*Rhamdia quelen*), nativo da região Sul do Brasil, vive em rios e lagos e ocupa lugares escuros, escondendo-se no fundo de poços (GUEDES, 1980).

Uma forma de diagnosticar os efeitos tóxicos que afetam direta ou indiretamente os tecidos animais é a histologia; no entanto, não é um método específico para determinar as contaminações. Somente um estudo do tecido não especifica a causa pontual da lesão e não faz um diagnóstico da contaminação. Fornece somente uma resposta biológica do tecido à contaminação e ao estresse, que é uma situação praticamente inevitável no meio ambiente aquático, principalmente em se tratando de produção de peixes, visto que os animais muitas vezes são submetidos a condições ambientais adversas. Associado a outro método, pode auxiliar na compreensão de determinadas situações, e assim, alterações metabólicas podem indicar uma contaminação de ação tóxica ou crônica desses agentes nos tecidos animais (LINS *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente estudo pretende investigar as reservas energéticas do jundiá frente à exposição aguda aos pesticidas Glifosato e Herbimix, bem como a recuperação do animal em períodos previamente estipulados. Para isso, utilizar-se-á análises da glicose e lactato sanguíneo e do glicogênio muscular e

no fígado. Também será avaliada a recuperação fisiológica dos jundiás após a submissão aos agentes estressores, possibilitando validar o uso do jundiá como um importante indicador para contaminações por agroquímicos nas águas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Analisar o efeito da intoxicação aguda por agroquímicos (Glifosato e Herbimix), do estresse e a combinação de ambos; e as diferentes respostas em relação a períodos de recuperação dos produtos sobre o metabolismo de carboidratos em jundiás.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o uso do jundiá como bioindicador ambiental em casos de contaminação por Glifosato e Herbimix.
- b) Observar as alterações no metabolismo do jundiá sob contaminação aguda devido à exposição aos agroquímicos Glifosato e Herbimix, através da determinação da glicose e do lactato sanguíneo.
- c) Testar o impacto dos defensivos Glifosato e Herbimix em estresse e em período de recuperação sobre o metabolismo de jundiá, através da determinação do glicogênio muscular e hepático.
- d) Verificar a relação entre as alterações provocadas no metabolismo por contaminação química e o estresse ambiental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil possui grande parte de sua economia voltada para a agricultura; assim, é bastante desenvolvido o consumo de insumos agrícolas, como inseticidas e herbicidas. Agroquímicos são produtos químicos usados em lavouras para o combate de pragas agrícolas, na pecuária, ou mesmo no ambiente doméstico (SOUZA & FAVARO, 2012). A utilização de pesticidas na agricultura contamina rios, córregos e açudes, gerando um problema de grande importância, já que resíduos não-seletivos atingem, também, organismos não-alvos, causando sérios danos, especialmente à fauna aquática (ORUÇ & ÜNER, 1999). Uma das formas de medir a contaminação por herbicidas é a avaliação da dose letal DL_{50} ou CL_{50} , que indica a quantidade de tóxico que leva à morte 50% dos indivíduos de uma população (MOURA *et al.*, 2013).

2.1 Bioindicador ambiental

Um bioindicador ambiental é uma espécie, ou grupo de espécies, cuja presença e abundância irão retratar, no ecossistema em que se encontram modificações bioquímicas, genéticas, fisiológicas, morfológicas, ecológicas ou comportamentais resultantes de uma interferência externa na natureza química ou física (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008). Nesse contexto, a Ecotoxicologia utiliza bioindicadores para avaliar os efeitos negativos de poluentes químicos (naturais ou sintéticos) sobre diversos níveis de organização biológica, tais como as células, os organismos, as populações, as comunidades biológicas e os ecossistemas. Por essa razão, os métodos ecotoxicológicos têm sido amplamente utilizados para estudar, a curto e longo prazo, problemas causados à biota de sistemas ambientais aquáticos (DORNFELD *et al.*, 2001).

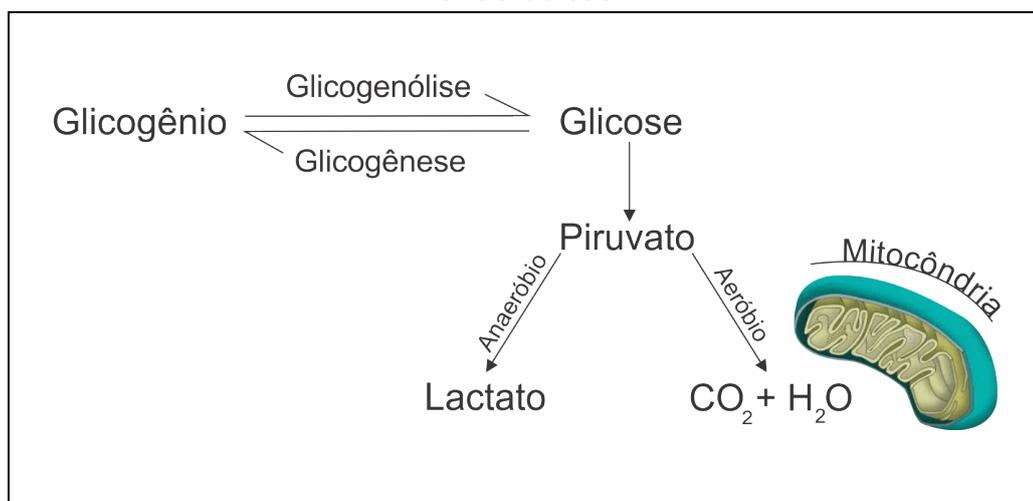
A relevância de estudos ambientais utilizando bioindicadores de poluição causada por agroquímicos reside no fato de os distúrbios no meio ambiente levarem, primeiramente, a alterações nas reações bioquímicas em determinados organismos. A análise preliminar desses rearranjos bioquímicos proporciona uma previsão de problemas no ecossistema antes que seja totalmente alterado (BUCHELI & FENT, 1995).

2.2 Glicogênese, glicose e lactato

A glicose é o combustível para que as reservas de carboidratos estoquem glicogênio, que será utilizado nos processos metabólicos em animais, tanto na presença como na ausência de oxigênio, conforme representação na Figura 1 (LEHNINGER *et al.*, 2002). O fígado estoca glicose para consumo extra-hepático e o músculo estoca glicose para consumo próprio. O fígado, principal órgão de metabolismo de substâncias tóxicas, é utilizado para avaliar a alteração do consumo energético associada à contaminação por poluentes químicos, através das taxas de glicose (SANCHO *et al.*, 1998). A síntese do glicogênio (glicogênese) é estimulada quando os níveis de energia e disponibilidade de substrato estão elevados, e sua degradação (glicogenólise) aumenta quando os níveis de energia e suprimentos disponíveis de glicose estão baixos. Esse processo energético se dá na presença de oxigênio; ou seja, trata-se de uma degradação aeróbica (SEIXAS FILHO, 2004).

Para a obtenção de energia nos processos anaeróbicos ocorre a fermentação da glicose em ácido pirúvico, e como produto resultará o ácido láctico. Os níveis de lactato têm sido muito utilizados como medida de metabolismo anaeróbico, pois o aumento desta atividade metabólica parece ser uma resposta rápida para a depleção de energia causada pela falta de oxigênio que ocorre após exposição a componentes tóxicos (ORUÇ & ÜNER, 1999).

Figura 1 – Síntese e degradação e síntese do glicogênio, vias aeróbicas e anaeróbicas



Fonte: Elaborada pela autora.

2.3 Interferência do estresse no metabolismo de peixes

Estresse é o mecanismo de compensação no processo adaptativo de animais que ocorre quando suas funções normais sofrem alterações frente a fatores físicos ou químicos (SANCHO *et al.*, 1998). As condições que proporcionam estresse são praticamente inevitáveis em ecossistemas aquáticos nos dias atuais, destacando-se as variações ambientais com o manejo e as contaminações por produtos químicos. Os peixes têm uma capacidade natural de restabelecer os fatores fisiológicos alterados por interferências externas; porém, quando esses mecanismos adaptativos são muito intensos, podem ser nocivos à saúde desses animais (BARCELLOS *et al.*, 2012).

Nos peixes o cortisol age principalmente no fígado, mantendo os níveis glicêmicos, pois estimula a síntese do glicogênio de outras fontes que não carboidratos e regula o consumo de açúcar na circulação periférica. Após estresse, os níveis de cortisol se elevam e a glicemia pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterada. O mesmo pode ocorrer nas reservas de glicogênio hepático. A gliconeogênese é estimulada pela ação glicocorticóide do cortisol em peixes, facilitando a manutenção das reservas energéticas a longo prazo, ao invés da mobilização energética a curto prazo promovida pela glicose (MOMMSEN *et al.*, 1999).

Entretanto, frente a uma exposição aguda, o uso de concentrações subletais de Glifosato demonstra uma dificuldade de resposta a estresse adicional, prejudicando o desenvolvimento do animal (CERICATO *et al.*, 2008).

2.4 Glifosato

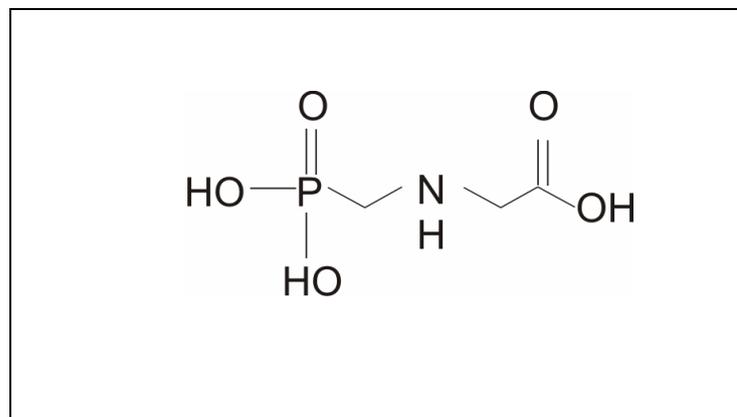
Atualmente, o Glifosato, vendido sob o nome comercial Roundup (Roundup®) [N-(fosfometil)-glicina, ${}^{-}\text{HO}_3\text{PCH}_2\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{COOH}$] (Figura 2), é o principal herbicida utilizado no mundo, derivado de aminoácido é um organofosforado que apresenta alta solubilidade em água, sendo aplicado em inúmeras culturas (MOURA, 2009). Sua formulação comercial é uma associação de sal de isopropilamina de glifosato, água e polioxietileno amina (POEA), substância tóxica e

não-iônica presente na formulação a fim de aumentar a eficácia dos ingredientes ativos e garantir a penetração do herbicida em plantas (BRAUSCH & SMITH, 2007).

A contaminação por esse pesticida pode não ser percebida imediatamente, pois se apresenta em meio aquático com valores abaixo da CL50; no entanto, contaminações subletais podem alterar significativamente o processo metabólico de peixes (SANCHO *et al.*, 1992). Na Resolução nº357, de 17 de março de 2005, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu para parâmetro orgânico glifosato o valor máximo de 65 µg.L⁻¹ para águas doces (CONAMA, 2005).

Segundo informações da empresa fabricante do Glifosato, levando em consideração exposições agudas ao veneno, o produto é biodegradável e seu uso não proporciona contaminação das águas; no entanto, os resultados de um estudo realizado com embriões de anfíbios fizeram com que, em 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) incluísse o produto na lista de Reavaliação Toxicológica (LONDRES, 2011).

Figura 2 – Fórmula estrutural molecular do glifosato



Fonte: Elaborada pela autora.

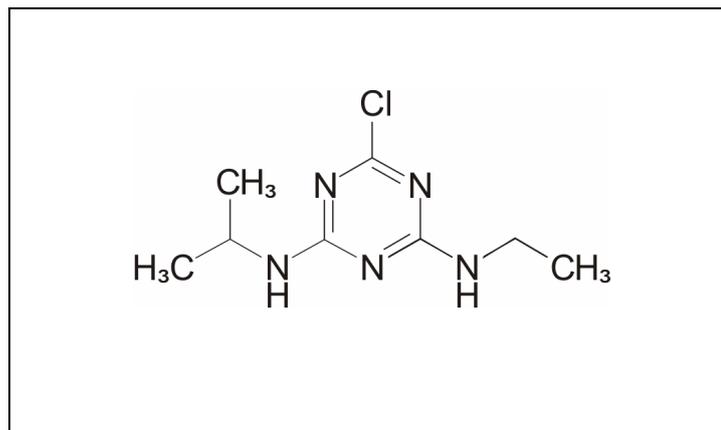
2.5 Herbimix

Segundo o registro no Ministério da Agricultura, o herbicida do grupo químico triazina, comercializado como Herbimix, é um agrotóxico seletivo para a cultura do milho, que pode ser aplicado antes ou após a emergência da cultura e das plantas infestantes. Sua classificação toxicológica é IV - pouco tóxico, sendo um produto de uso exclusivamente agrícola, e sua persistência no ambiente é bastante alta. Conforme informação do fabricante, o princípio ativo da formulação é a atrazina

(Figura 3) [1-cloro-3-etilamina-5-isopropilamino-2,4,6-triazina] (45% m/m) + simazina (Figura 4) [6-cloro-N,N,dietil-1,3,5, triazina-2,4-diamina] (45% m/m) (ANVISA, 2009).

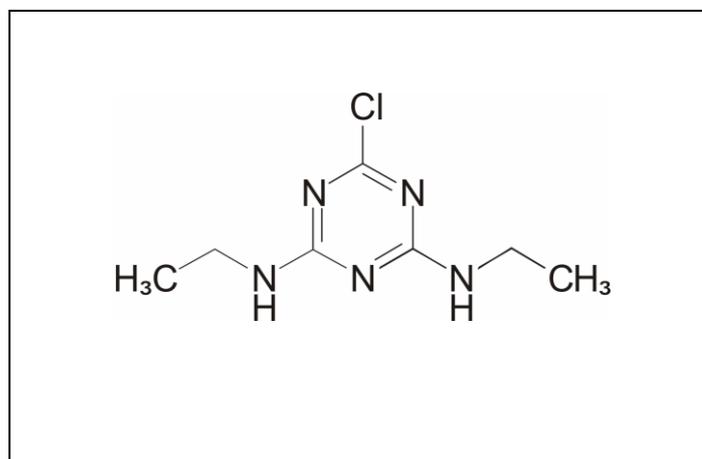
Organismos terrestres e aquáticos expostos ao herbicida simazina mostraram inúmeros efeitos ecológicos, especialmente a bioacumulação em organismos aquáticos. Segundo Strandberg e Scott-Fordsmand (2002), a toxicidade desse agroquímico está relacionada a variações bióticas e abióticas em ecossistemas aquáticos. Segundo a ficha técnica do produto, devido às exposições repetidas aos tóxicos os efeitos crônicos da atrazina e da simazina comprovam vários problemas na saúde de mamíferos, destacando-se lesões de fígado, sangue, coração e tumores nos rins, entre outros (ANVISA, 2009). Na Resolução nº357, de 17 de março de 2005, o CONAMA estabeleceu para parâmetros orgânicos simazina e atrazina o valor máximo de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para águas doces (CONAMA, 2005).

Figura 3 - Fórmula estrutural molecular da atrazina



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4 – Fórmula estrutural molecular da simazina



Fonte: Elaborada pela autora.

2.6 O jundiá (*Rhamdia quelen*)

A piscicultura representa boa fonte de renda, pois é de fácil manejo e baixo custo. Atualmente, a aquicultura tem se desenvolvido com espécies exóticas; no entanto, as espécies nativas têm demonstrado bom potencial de produção e, também, ampla aceitação no mercado. Peixes são uma excelente fonte de proteínas e os médicos indicam o consumo semanal dessa fonte de ácidos graxos e ômega 3 para uma vida saudável. Sendo a região Sul do Brasil geograficamente privilegiada para a cultura do pescado devido às condições hidrográficas, há necessidade de estudos que implementem a produção (BARCELLOS, 2012).

Natural da América Central e da América do Sul, o jundiá (*Rhamdia quelen*) (Figura 5) é uma espécie da família Heptapteridae e está distribuído do Sudoeste ao Norte do México e no Centro ao Sul da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). É encontrado no fundo de rios e lagos, associado a ambientes de águas calmas, escondendo-se sob troncos e pedras durante o dia. O jundiá, de hábitos alimentares noturnos, é considerado omnívoro, alimentando-se preferencialmente de peixes, crustáceos e insetos, podendo, também, ser incluídos em sua dieta sedimentos, vegetais e muco (GUEDES, 1980; MEURER; ZANIBONI FILHO, 1997).

A espécie apresenta boa tolerância a variações térmicas, suportando amplitudes de 15 a 34°C, sendo seu crescimento incrementado pelo aumento da temperatura. A fêmea é maior do que o macho adulto (GURGEL, 1979; WEIS, 1980) e, por volta de um ano de idade, ambos atingem a capacidade reprodutiva (NARAHARA *et al.*, 1985).

Os peixes, consumidores secundários, são considerados bons indicadores ambientais por estarem no topo da cadeia alimentar, serem omnívoros e facilmente acumularem poluentes persistentes (MOLLERKE *et al.*, 2003).

Figura 5 – Jundiá (*Rhamdia quelen*): comprimento aproximado de 30 cm, peso aproximado de 95g



Fonte: Agrocomércio, [s.d.].

2.7 Biotransformação

Os peixes reagem a poluentes químicos ambientais através de alterações metabólicas, procurando uma adaptação ao estresse sofrido. A biotransformação esclarece a desintoxicação e a ativação de xenobióticos (PACHECO & SANTOS, 2002).

Quando peixes são expostos a compostos químicos tóxicos e esses são absorvidos, as formas de distribuição poderão ser: armazenamento, que ocorre no tecido adiposo e quando esses lipídios forem utilizados pelo animal haverá mobilização do químico; distribuição direta para um órgão alvo, como o fígado ou o cérebro, causando uma ação direta; ou, ainda, eliminação pelo processo de excreção do animal. A resposta do animal será transformar os compostos absorvidos. A maioria desses compostos é lipofílica e serão transformados em produtos hidrofílicos, aumentando a polaridade e facilitando a eliminação (SCHLENK, 2005).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local

As análises de laboratório foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal do Unilasalle, em Canoas, RS, e os experimentos de contaminação aguda e controle dos períodos de recuperação ocorreram no Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária (CEPAGRO) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo.

3.2 População experimental

Os peixes estudados são provenientes do criatório do CEPAGRO. Os animais foram acondicionados em tanques de 6.200 litros em uma das estufas do Laboratório de Fisiologia de Peixes (LFP). A partir desse estoque, os peixes foram transferidos e distribuídos pelas unidades experimentais (tanques de tratamento), conforme o protocolo de cada experimento.

3.3 Aspectos ambientais

Tomaram-se os devidos cuidados com o descarte da água utilizada para a contaminação dos peixes durante a exposição aguda aos herbicidas, permanecendo por um período mínimo de 30 dias em tanques de fibra de vidro para, em seguida, ser percolada em sumidouro, conforme descrito por Kreutz *et al.* (2008). Da mesma forma, os peixes mortos e abatidos tiveram o descarte ambientalmente adequado, sendo congelados e descartados em coletores de lixo biológico que são recolhidos por empresa especializada, juntamente com o lixo hospitalar proveniente do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo.

3.4 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi devidamente encaminhado ao Comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo, onde está oficialmente institucionalizado com parecer favorável, assim como os projetos anteriores relacionados ao tema de estudo.

3.5 Tempo de exposição

Inicialmente, os peixes foram submetidos a uma exposição aguda ao agroquímico. O tempo considerado como exposição aguda foi de 96 horas, como recomenda a NBR 15088:2004, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para testes de toxicidade aguda com peixes.

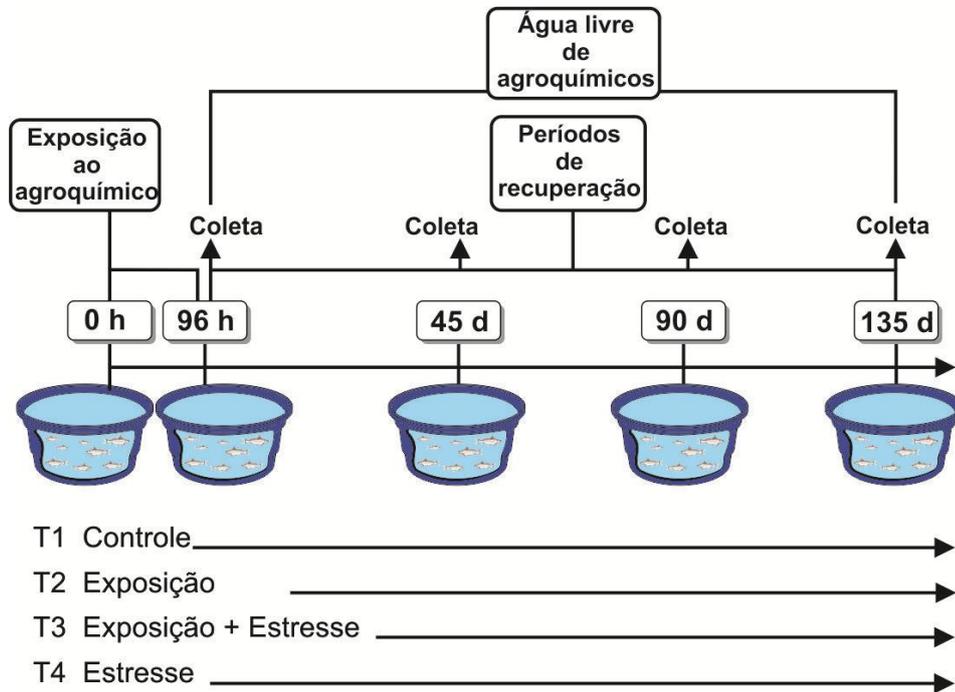
3.6 Agroquímicos testados

Os defensivos testados foram previamente avaliados, sendo utilizados dois agroquímicos que provocam bloqueio do eixo hipotálamo-hipófise (CERICATO *et al.*, 2008; 2009). O Glifosato, herbicida de maior consumo mundialmente nos dias atuais, é utilizado em diversas culturas, inclusive com uso doméstico, e considerado pelo fabricante de baixa toxicidade (classe IV); no entanto, é o segundo mais frequente em casos de acidente por envenenamento por herbicidas (RECENA *et al.*, 2006). O Herbimix, uma associação de atrazina+simazina, largamente utilizado em lavouras de milho e soja, representa 30% do mercado mundial, sendo um herbicida triazínico bastante persistente no ambiente; por isso, um dos efeitos ecológicos relatados é a bioacumulação em organismos aquáticos (STRANDBERG & SCOTT-FORDSMAND, 2002).

3.7 Experimento

O experimento foi conduzido em duas etapas: na primeira, os peixes foram submetidos à exposição aguda, com 50% da DL_{50} por 96 horas, onde foram avaliados os efeitos dos agroquímicos sobre o metabolismo de carboidratos e os efeitos metabólicos na associação da contaminação aguda e o estresse; na segunda etapa os peixes restantes em cada tanque, foram transferidos para tanques com água limpa (sem a presença de agroquímicos), então foram avaliadas as alterações no metabolismo de carboidratos nos períodos estipulados para recuperação (45, 90 e 135 dias), conforme representado na figura 6.

Figura 6 – Representação do experimento



Fonte: Elaborada pela autora.

Durante o período de adaptação, os peixes receberam dieta inerte, uma vez ao dia, fornecida na taxa de 1% da biomassa dos espécimes. No período de 96 horas de contaminação os peixes foram alimentados normalmente, com ração, duas vezes ao dia. A água utilizada nos tanques de tratamento provinha de poço artesiano. Previamente ao início do período experimental e ao término deste foram monitorados: nível de oxigênio dissolvido na água das unidades experimentais, utilizando-se um oxímetro digital marca YSI 550A; o pH, através de um peagâmetro digital da marca Solar SL110; a temperatura; o íon amônio, nitratos e nitritos, por método colorimétrico; a condutividade elétrica através de um condutímetro digital da marca Bernauer; e a dureza e a alcalinidade por método colorimétrico.

3.7.1 Tratamentos

No tratamento 1, a amostra foi considerada como população controle (CTR) e, nele, os peixes não foram submetidos nem a estresse nem a exposição ao agroquímico testado. No tratamento 2 os peixes foram expostos aos agroquímicos

Glifosato ou Herbimix e não foram submetidos ao estresse. No tratamento 3 os peixes foram expostos aos agroquímicos Glifosato ou Herbimix, nas quantidades citadas na Tabela 1, associada à aplicação de estresse, visando verificar os fatores fisiológicos alterados na resposta ao estressor. Já o tratamento 4 foi constituído de peixes expostos apenas ao estresse(ST), sem a presença do agroquímico.

Tabela 1– Concentração dos agroquímicos usados na intoxicação aguda

Defensivo agrícola	CL ₅₀ para jundiá	T1 (controle)	T2 (agroquímico)	T3 (agroquímico + estresse)	T4 (estresse)
Atrazina + simazina	10,5 ^A (8,9 - 12,4)	0	50% (5,25) ^B	50%(5,25) ^B	0
Glifosato	7,3 ^A (6,5 - 8,2)	0	50%(3,65) ^B	50%(3,65) ^B	0

^AConcentração letal para 50% dos animais em exposição aguda (96horas). Intervalo de confiança (95%).

^BConcentração do agroquímico usada nos testes. Concentrações em mg.L⁻¹.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.7.2 Etapa 1

Na etapa de contaminação, os peixes foram distribuídos em cinco tanques de 100 litros para cada tratamento, com 15 peixes em cada tanque, que passaram por um período de adaptação de sete dias nas unidades experimentais, onde foram observados para a detecção de possíveis problemas e mortalidades. Nos tanques, após sete dias, realizou-se a contaminação com a dose descrita na Tabela 1, para cada contaminante, onde os peixes permaneceram por 96 horas. Nos tanques do tratamento T3 (associação agroquímico+estresse) os peixes permaneceram na água com a contaminação na dose subletal do agroquímico específico e foram submetidos a um estresse manual extremo, sendo que na 95^a hora de exposição foi aplicado o estressor agudo, através de padrão de perseguição com puçá, estabelecido como estressor agudo para a espécie em estudos anteriores. O tempo de coleta foi de uma hora após a aplicação do estressor agudo, pois é neste momento que ocorre o pico de liberação do cortisol no jundiá (BARCELLOS *et al.*, 2001; 2003).

O T4 foi considerado o grupo estressado, onde os peixes ficaram em água limpa livre de contaminante e foram submetidos a um estresse manual extremo, sendo aplicado na 95ª hora de exposição o estressor agudo padrão.

3.7.3 Etapa 1- Parâmetros avaliados

Após as 96 horas iniciais da etapa 1, para as amostragens, os peixes foram capturados com ajuda de rede puçá, pesados e anestesiados com (MS222Finquel® 300 mg.l⁻¹ tamponado com 600 mg.L⁻¹ de NaHCO₃); devido à alta acidez, o fabricante recomenda tamponamento para evitar efeitos fisiológicos indesejados (ROUBACH & GOMES, 2001). Após a perda de postura, as amostras de sangue foram coletadas por meio de secção do plexo caudal, utilizando-se capilares micro-hematócitos não-heparinizados para a coleta, sendo posteriormente acondicionados em tubos para coagulação. Os tubos foram encaminhados para centrifugação. Depois de formado e retraído o coágulo, o soro foi congelado em tubos do tipo *Eppendorf* para posterior análise. Depois deste procedimento, os peixes foram abatidos por secção medular e dissecados para a coleta de fígado e músculo, sendo as amostras embaladas em papel alumínio e acondicionadas em garrafas com nitrogênio líquido para imediato congelamento e encaminhamento a análises posteriores. Até o dia da análise dos tecidos as amostras coletadas permaneceram preservadas sob congelamento em equipamento refrigerado.

3.7.3.1 Análise do tecido

Feita a coleta de material de tecidos hepático e muscular, analisou-se a concentração de glicogênio. A extração de glicogênio segue o método de Van Handel (1965), sendo o glicogênio quantificado como glicose, após hidrólise ácida e neutralização.

Para a digestão das amostras foram utilizados, aproximadamente, 100mg de fígado e 100mg de tecido muscular em meio básico com solução aquosa de KOH 30%, a 100°C, em banho-maria, por 1 hora. Após a digestão das amostras, adicionaram-se 5 gotas de solução saturada de sulfato de sódio (Na₂SO₄) aos tubos resfriados, que foram agitados em Vortex da marca Biomixer, modelo QL-901, até a eliminação das bolhas de gás carbônico (CO₂). Em seguida, adicionaram-se 4ml de

álcool etílico, sendo as amostras novamente agitadas e levadas para centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pelet* lavado com 2 ml de água quente, sendo adicionados novamente, 4ml de álcool etílico e agitado, retornando para centrifugação nas mesmas condições anteriores. O procedimento foi repetido por três vezes seguidas.

No próximo passo, o *pelet* foi ressuspenso com 2 ml de água quente, e 500µl dessa solução foram transferidos para outro tubo, onde foram adicionados 500µl de ácido clorídrico (HCl) 4N. A solução foi aquecida em banho-maria por 1 hora, a 100°C, em tubos tampados. Depois de resfriados, foram removidas as bolhas com Na₂CO₃ 3M. Dando continuidade às análises, o procedimento seguiu especificações do *kit* de glicose (Labtest) para as quantidades amostrais, sendo que para o fígado foi utilizada uma amostra de 10µl, e para músculo, de 80µl.

3.7.3.2 Análise do sangue

O sangue foi coletado do plexo caudal por capilares, e após centrifugação foi separado o plasma do material sólido. O plasma foi congelado para posteriores análises. No sangue coletado, o plasma separado foi usado para a determinação da glicose sanguínea através do *kit* de glicose oxidase (Brasil) Labtest e do lactato que foi determinado através do *kit* de análise bioquímica da Katal (Brasil).

3.7.4 Etapa 2

Concluída a primeira fase da pesquisa, objetivando avaliar a recuperação dos efeitos provocados pelos defensivos em exposição aguda (fase 1), após a amostragem de dois animais por unidade experimental (fase 1; n=10), os peixes restantes (sobreviventes) foram transferidos para 12 tanques de 900 litros (três por tratamento), com água livre do agroquímico para a avaliação de seu processo metabólico após contaminação, sob condições ideais já estabelecidas para a espécie, constituindo-se de tanques de paredes azuis com refúgios escuros (BARCELLOS *et al.*, 2009) (Figura 6). O período de avaliação ocorreu nos dias 45, 90 e 135. Esse tempo foi estipulado com base em dados zootécnicos da espécie (SILVA *et al.*, 2008) e em informações referentes à recuperação de efeitos oxidativos (MIRON *et al.*, 2008).

Figura 7 – Tanques onde os peixes ficaram durante o período de recuperação



Fonte: Foto reproduzida pela autora, maio de 2012.
Local: CEPAGRO – FAMV

3.8 Teste de resposta ao estresse

Nos dias determinados para tratamento (45, 90 e 135) foi aplicado o estressor agudo de perseguição com rede em todos os peixes dos tanques T3 e T4. Após uma hora, os peixes foram capturados e foi coletado seu sangue (para a determinação de glicose e lactato). Após abate, coletou-se o fígado e o músculo para a determinação de glicogênio.

3.9 Manutenção dos tanques no período de recuperação

Durante a recuperação das espécies avaliadas, os tanques foram monitorados conforme as condições ótimas de criação. Os tanques utilizados são de fibra de vidro com paredes azuis e dotados de refúgios escuros (BARCELLOS *et al.*, 2009), equipados com sistema de aeração independente e limpos diariamente por sifonamento. Semanalmente, ou em períodos menores, de acordo com as medições dos parâmetros de qualidade da água, procedeu-se à renovação de, pelo menos,

30% do volume da água. Os peixes foram alimentados até a saciedade duas vezes por dia, sempre verificando o consumo para evitar sobras de ração.

3.10 Análise estatística

Na Fase 1, para os resultados dos tratamentos controle (T1), agroquímico (T2), defensivo + estresse (T3) e estresse (T4) de cada agroquímico foi aplicado o teste estatístico ANOVA one way, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Por se tratar de defensivos totalmente diferentes, não foi realizada comparação entre eles.

Na Fase 2, os resultados de cada tratamento em cada dia de amostragem (45, 90 e 135) foram comparados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguido do teste de Tukey. Para analisar se os dados utilizados foram paramétricos, o teste de Hartley e o teste de Kolmogorov-Smirnov foram analisados para testar a normalidade dos dados. Tanto na fase 1 quanto na fase 2 todas as análises tiveram nível de significância de $P < 0,05$ e foram realizadas por meio do programa Graph Pad In Stat 3,00 (Graph Pad Software, San Diego, California, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

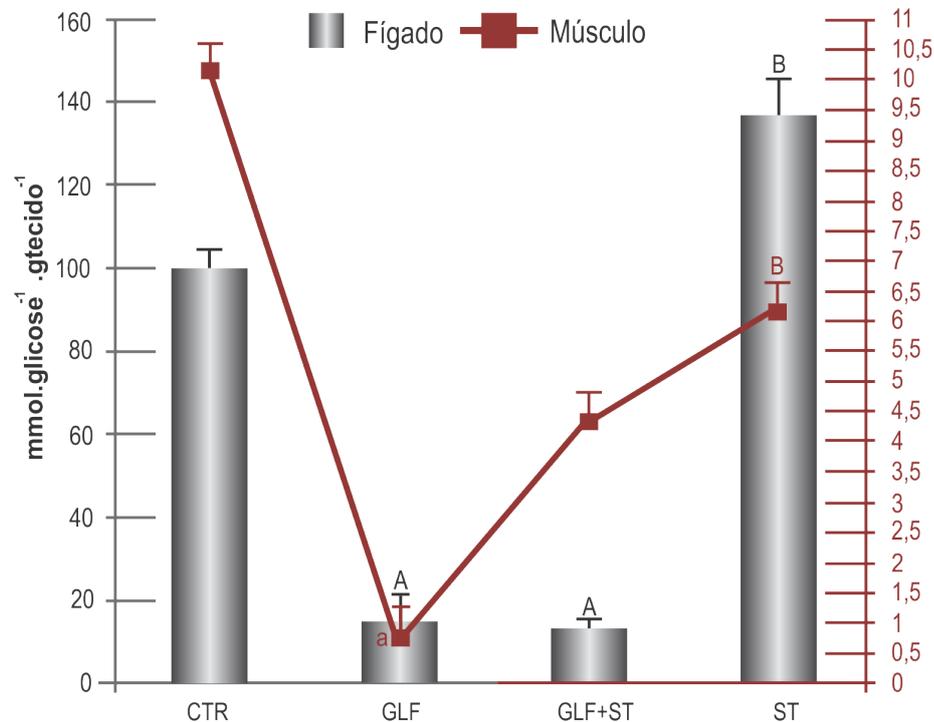
4.1 Glifosato

4.1.1 Etapa 1 – Intoxicação aguda

4.1.1.1 Tecidos hepático e muscular

A quantidade do glicogênio no tecido do fígado teve um decréscimo $P < 0,05$ tanto para o grupo exposto ao GLF ($\pm 85\%$) como para associação (GLF+ST) ($\pm 86\%$). No tecido muscular, o grupo exposto ao GLF ocorreu redução ($\pm 92\%$) na quantidade de glicogênio, quando comparado ao grupo controle. Comparando grupo ST com o GLF e GLF+ST observa-se um aumento significativo para ambos os tecidos, como mostram os dados apresentados na figura 8.

Figura 8 – Glicogênio no fígado e músculo, intoxicação aguda do glifosato



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Na figura 8: Resultados expressos como média \pm erro padrão. O (A) indica a diferença significativa entre o controle e os tratamentos no fígado, o (a) indica diferença significativa entre o controle e os tratamentos no músculo e o (B) indica diferença significativa entre ST, e o GFS e GFS+ST, em ambos tecidos. ANOVA seguido de vários testes de Tukey ($P < 0,05$ e $n=6$).

Os resultados encontrados indicam um desajuste metabólico, gerando um gasto energético. Resultados semelhantes foram encontrados com outros agroquímicos, metil paration e tebuconazole, na intoxicação aguda da mesma espécie, indicando uma resposta ao estresse químico sofrido pelo animal. Sendo assim, o glicogênio foi rapidamente degradado tanto no músculo como no fígado, provavelmente para manter a demanda energética dos processos metabólicos (MATTE, 2013). Estudos em que foram utilizados piava e glifosato nas concentrações de 1 e 5 mg.L⁻¹ por 90 dias mostraram uma redução nos níveis de glicogênio no fígado e uma perda de peso do animal, sugerindo que o gasto de energia para desintoxicar o químico alterou o metabolismo de carboidrato e proteína (SALBEGO *et al.*, 2010). GLUSCZAK (2007), avaliando a mesma espécie citada acima e o mesmo agroquímico, também foi observada a diminuição do glicogênio hepático e muscular.

Em outro estudo com tecido hepático, Crestani (2004) avaliou a mesma espécie, sob efeito do clomazone, e observou um aumento do glicogênio do fígado. Avaliando nas mesmas condições desse experimento, mas com concentrações de glifosato diferentes, 0,2 e 0,4 mg.L⁻¹, Gluszczak *et al.* (2007), observaram o aumento nos níveis de glicogênio para o tecido hepático. Oruç e Üner (1999) sugerem que foi utilizado o glicogênio muscular como fonte de energia para compensar situação de estresse e acumular reservas no fígado caso a contaminação persistisse. Sendo assim, o glicogênio muscular pode apresentar respostas diferenciadas, aumentando ou diminuindo, havendo variação em alguns casos conforme a espécie avaliada, o agroquímico testado e, ainda, as concentrações usadas.

Pode-se propor que a alteração do glicogênio hepático no T2(GLF) e T3(GLF+ST), e do T2(GLF) no músculo seja resultante do agroquímico e não do estresse físico de perseguição, pois é sabido que a primeira resposta ao estresse é desencadear o mecanismo de “luta ou fuga” através das catecolaminas que estimulam a mobilização da glicose como fonte de energia para todos os órgãos (SAPOLSKI,1990). Em estudo com jundiá, Koakoski *et al.* (2014) relatam que o glifosato não altera os níveis de cortisol, o que reforça a ação das catecolaminas sobre a redução das reservas de glicogênio hepático e não de um glicocorticóide (WENDELAAR BONGA, 1997).

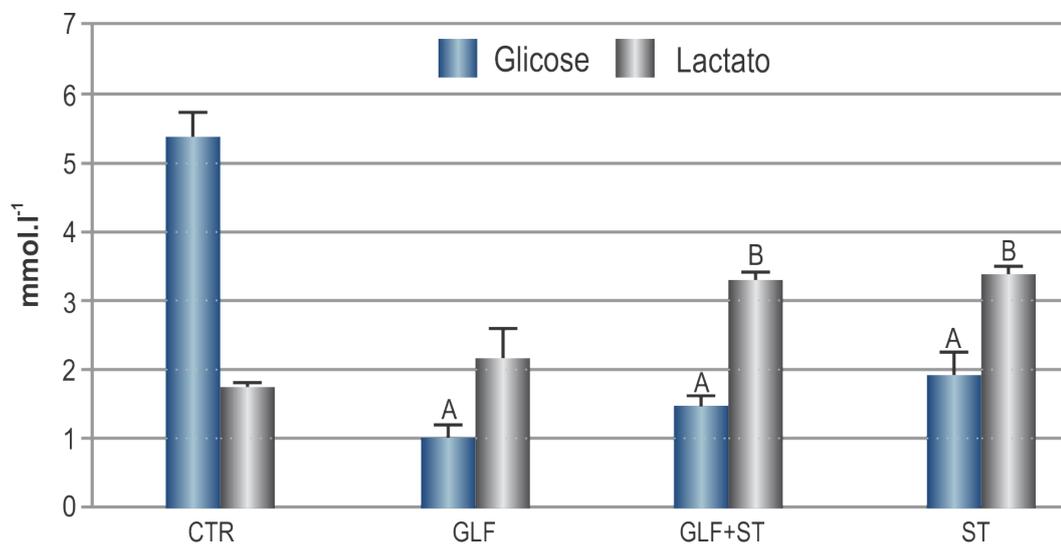
Entretanto, quando jundiás são expostos somente ao estresse (ST) tem-se uma elevação em relação ao GLF e GLF+ST no glicogênio hepático compatível com

o aumento dos níveis de cortisol, também em situação de estresse, encontrado por Koakoski *et al.* (2014) em jundiás expostos ao glifosato, visto que o cortisol pode ter uma função catabólica no metabolismo protéico muscular e promoveria uma gliconeogênese a partir de aminoácidos extra-hepáticos, mantendo, assim, as reservas de glicogênio hepático (WENDELAAR BONGA, 1997).

4.1.1.2 Plasma sanguíneo

A glicose plasmática demonstrou um decréscimo significativo nos três tratamentos em que os animais foram submetidos, T2(GLF) ($\pm 81\%$), T3 (GLF+ST) ($\pm 73\%$) e T4 (ST) ($\pm 63\%$), e o lactato um aumento acima de 100% ($P < 0,05$) nos tratamentos GLF+ST e ST, conforme a figura 9, abaixo. Os resultados sugerem que na possível diminuição de oxigênio pela presença do químico a busca pela homeostase leva ao uso de uma rota alternativa, que pode ser explicada pelo aumento de lactato.

Figura 9 – Glicose e lactato no plasma, intoxicação aguda do glifosato



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Na figura 9: Os valores de glicose e lactato no plasma, expressos como média \pm erro padrão. (A) indica a diferença significativa entre o controle e os tratamentos na glicose, e o (B) indica diferença significativa entre o controle e os tratamentos no lactato. ANOVA seguido de vários testes de Tukey $P < 0,05$, $n=6$

O ácido láctico é uma reserva energética que irá para o fígado para produção de glicogênio, mas o aumento de lactato no sangue pode ser ainda apenas uma demora de consumo e não um aumento de produção, sugerindo uma reserva que poderia ser usada por outros órgãos para a ressíntese da glicose e glicogênio (SCHIMDT-NIELSEN, 2002).

Matte (2013) também relatou uma redução nos níveis de glicose plasmática quando jundiás foram submetidos à intoxicação aguda por metil paration e tebuconazole. Becker *et al.* (2009) sugerem uma desorganização metabólica ou um aumento no consumo de glicose promovido pela ação do agroquímico. As alterações nos níveis de glicose plasmática podem indicar mudanças no metabolismo dos carboidratos, assim como o aumento da glicogenólise no tecido hepático (SANCHO *et al.*, 1998).

Resultados encontrados, em outros estudos com peixes e agroquímicos, foi observado um aumento na glicose plasmática associada a um decréscimo do glicogênio muscular, como no estudo com jundiá exposto a 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de clomazone (CRESTANI, 2004). Sendo assim, supõe-se que a hipoglicemia encontrada neste estudo esteja relacionada com a exaustão de reservas, tanto no fígado como no tecido muscular.

O lactato sanguíneo teve um aumento significativo no agroquímico + estresse, respondendo da mesma forma quando submetido apenas ao estresse físico. De acordo com os resultados encontrados, quando o jundiá foi exposto ao metil paration e ao tebuconazole, os resultados de lactato plasmáticos foram semelhantes (MATTE, 2013) e a mesma espécie submetida ao clomazone também teve os valores de lactato aumentados (CRESTANI, 2004). Pode-se observar que, mesmo com agroquímicos de grupos químicos diferentes, o lactato plasmático sofre alterações. No entanto, relatado num estudo com pacu sob efeito de triclorfon não teve alterados os índices de lactato no sangue (VENTURINI, 2010).

Outros tecidos também apresentaram aumento ($P < 0,05$) do lactato quando submetidos ao estresse químico. Salbego *et al.* (2010) constataram este aumento no tecido muscular e hepático da piava submetida ao glifosato em concentrações de 1 e 5 mg.L⁻¹, e da mesma forma no tecido muscular da piava submetida a concentrações de 3, 6, 10 e 20 mg.L⁻¹ (GLUSCZAK *et al.*, 2005).

4.1.2 Etapa 2 - Recuperação

4.1.2.1 Tecidos hepático e muscular

Após alterações nos tratamentos GLF e GLF+ST, provocados pelo estresse químico e associados com estresse físico, os peixes permaneceram em água livre do agroquímico para o período de recuperação. No tecido hepático desses dois tratamentos as concentrações de glicogênio (Tabela 2) mostraram que 45 dias de recuperação foram suficientes para o restabelecimento das reservas de glicogênio.

Tabela 2 – Glicogênio no fígado, períodos de recuperação ao glifosato

		GLICOGÊNIO NO FÍGADO			
		T1(CTR)	T2(GLF)	T3(GLF+ST)	T4(ST)
Exposição	96 horas	99,21±27,17	14,69±7,14	13,47±1,75	134,2±47,16
	45 dias	151,89±22,10	175,42±7,78 a	175,41±29,65 a	120,75±11,02
Recuperação	90 dias	125,46±24,70	188,12±43,83 a	222,21±28,95 a	131,99±32,77
	135 dias	107,38±15,29	67,69±48,18	87,14±18,06	78,40±11,47

Fonte: Elaborada pela autora, 2014.

Na Tabela 2: O glicogênio ($\text{mmol.glicose}^{-1}.\text{gtecido}^{-1}$) é expresso como média \pm S.E.M. Na figura, o **a** minúsculo indica a diferença estatística entre a exposição aguda e os períodos de recuperação (coluna). ANOVA, seguido por vários testes de Tukey ($P < 0,05$, $n=6$).

O glicogênio hepático que havia sofrido grande depleção na exposição aguda (GLF) e na exposição associada ao estresse (GLF+ST), mostrou uma recuperação de seus valores em 45 dias, mostrando assim a capacidade desse órgão em restabelecer taxas metabólicas após um estresse químico agudo, pois quando foi submetido apenas ao estresse físico não demonstrou alteração significativa do parâmetro avaliado. A capacidade de regeneração hepática demonstra que suas células mantiveram suas funções para manutenção da homeostase, assim como os índices glicêmicos que foram regulados.

O perfil metabólico do tecido muscular não apresenta uma resposta similar nos períodos de recuperação quando comparado ao tecido hepático, pois 45 dias

foram suficientes para que o tecido muscular recuperasse os valores ($P < 0,05$) de glicogênio que haviam sido alterados frente ao grupo exposto; já no que se refere à recuperação do GLF+ST, observa-se uma elevação nos valores do glicogênio, porém eles ainda não apresentam um nível de significância estatística que possa indicar plena recuperação. Isso pode ser observado nos dados apresentados na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3 – Glicogênio no músculo, períodos de recuperação ao glifosato

GLICOGÊNIO NO MÚSCULO					
		T1(CTR)	T2(GLF)	T3(GLF+ST)	T4(ST)
Exposição	96 horas	10,09±2,04	0,75±0,27	4,29±1,46	6,19±2,69
	45 dias	8,30±2,55	10,52±2,96 a	7,31±1,96	14,55±3,08
Recuperação	90 dias	9,59±2,51	5,71±2,29	6,74±2,25	3,05±1,15
	135 dias	7,96±1,86	2,93±0,84	1,16±0,30	15,59±3,45

Fonte: Elaborada pela autora, 2014.

Conforme a Tabela 3, o glicogênio ($\text{mmol.glicose}^{-1}.\text{gtecido}^{-1}$) é expresso como média \pm S.E.M. Nela o **a** minúsculo indica a diferença estatística entre a intoxicação aguda e os períodos de recuperação (coluna). ANOVA, seguido por vários testes de Tukey ($P < 0,05$, $n=6$).

O tecido muscular teve suas reservas de glicogênio diminuídas após estresse químico, sendo que em 45 dias esses estoques fossem restabelecidos favorecendo assim, o catabolismo muscular, para que o conteúdo energético do animal fosse mantido. Sendo o catabolismo muscular essencial para que a energia seja armazenada nas células o estudo mostra a capacidade de recuperação do tecido após exposição aguda, restabelecendo as reservas para glicogenólise nesse tecido.

Usando tebuconazole em jundiás, Matte (2013) observou que mesmo um período de recuperação de 180 dias não foi suficiente para que as reservas de glicogênio muscular fossem restabelecidas, contrariando os resultados encontrados neste estudo. Entretanto, o mesmo autor relata que, quando usado metil paration na mesma espécie, o glicogênio muscular foi recuperado no grupo exposto em 90 dias, no grupo exposto+estresse em 180 dias e no estressado em 45 dias.

Os resultados indicam que a recuperação desse tecido pode variar conforme o produto testado, pois agroquímicos apresentam grupos orgânicos diferentes, e o processo de biotransformação ocorre com reações que dependem da ação desses grupos funcionais, e os tempos de recuperação.

4.1.2.2 Plasma

O período de 45 dias de recuperação foi suficiente para que os valores ($P < 0,05$) de glicose no plasma fossem recuperados em relação ao grupo controle em todos os tratamentos, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 –Glicose no plasma, períodos de recuperação ao glifosato

		GLICOSE NO PLASMA SANGUÍNEO			
		T1(CTR)	T2(GLF)	T3(GLF+ST)	T4(ST)
Exposição	96 horas	5,36±0,76	1,00±0,44	1,47±0,09	1,93±0,43
	45 dias	4,23±0,32	9,48±0,73 a	7,24±0,84 a	5,28±0,51 a
Recuperação	90 dias	4,30±0,43	3,58±0,24	6,79±0,13 a	6,22±0,73 a
	135 dias	3,15±0,10	3,04±0,36	2,98±0,29	4,13±0,53

Fonte: Elaborada pela autora, 2014.

Conforme a Tabela 4, o glicose (mmol.L^{-1}) é expresso como média \pm S.E.M. Na figura, o **a** minúsculo indica a diferença estatística entre a intoxicação aguda e os períodos de recuperação (coluna). ANOVA, seguido por vários testes de Tukey ($P < 0,05$, $n=6$).

Em um experimento com tebuconazole, a glicose plasmática continuou diminuindo até os 180 dias de recuperação, sendo esse período insuficiente para que o animal retomassem a homeostase, e o lactato seguiu aumentando ($P < 0,05$) sem sinais de recuperação (MATTE, 2013).

Já no lactato plasmático, é diferenciada a resposta deste metabólito, em todos os tratamentos, frente aos diferentes períodos de recuperação, pois, em vez de os valores reduzirem em direção aos valores do grupo controle, tem-se um aumento significativo do lactato, em todos os tratamentos, aos 45 dias de recuperação, o qual

permanece ainda elevado até 135 dias de recuperação, conforme representados na (Tabela 5).

Tabela 5 – Lactato no plasma, períodos de recuperação ao glifosato

		LACTATO NO PLASMA SANGUÍNEO			
		T1(CTR)	T2(GLF)	T3(GFS+ST)	T4(ST)
Exposição	96 horas	1,74±0,03	2,17±0,74	3,30±0,08	3,31±0,22
	<hr/>				
Recuperação	45 dias	2,88±0,28	8,89±0,59 a	7,16±0,57 a	8,41±0,84 a
	90 dias	4,90±0,71	4,98±0,07	8,38±0,17 a	5,78±1,24
	135 dias	7,05±1,42	4,04±0,27	8,80±0,13 a	5,60±0,47

Fonte: Elaborada pela autora, 2014.

Na tabela 5: O lactato (mmol.L^{-1}) é expresso como média \pm S.E.M. Na figura, o **a** minúsculo indica a diferença estatística entre os tratamentos e grupo controle. ANOVA, seguido por vários testes de Tukey ($P < 0,05$, $n=6$).

O ácido láctico que poderia ter sido acumulado no músculo, num período de recuperação do animal, foi liberado para corrente sanguínea, sugerindo um suprimento energético para outros tecidos.

Encontram-se na literatura muitos trabalhos sobre os efeitos de contaminantes em peixes, e os parâmetros analisados variam conforme o interesse da pesquisa. Enzimáticos, histopatológico e disfunção endócrina são exemplos de análises avaliadas, mas dados sobre o período de exposição e o tempo de recuperação são insatisfatórios. No entanto, a literatura apresenta trabalhos que avaliam outros parâmetros, como a ação do ácido tiobarbitúrico – TBARS, que está relacionada com estresse oxidativo, e a enzima acetil colinesterase – AChE, responsável por regulação de neurotransmissores e envolvida em sinapses químicas, normalmente é inativa frente a um agroquímico.

Avaliando AChE e TBARS no jundiá exposto ao clomazone, observou-se que a AChE no músculo foi recuperada após 96 horas, não sendo recuperada no tecido cerebral, e o TBARS no cérebro foi recuperado após 96 horas, não recuperando no fígado após o mesmo período (CRESTANI *et al.*, 2007); portanto, a ação dos

agroquímicos varia conforme o tecido, e os tecidos respondem de forma diferenciada à recuperação do estresse ao qual foram submetidos.

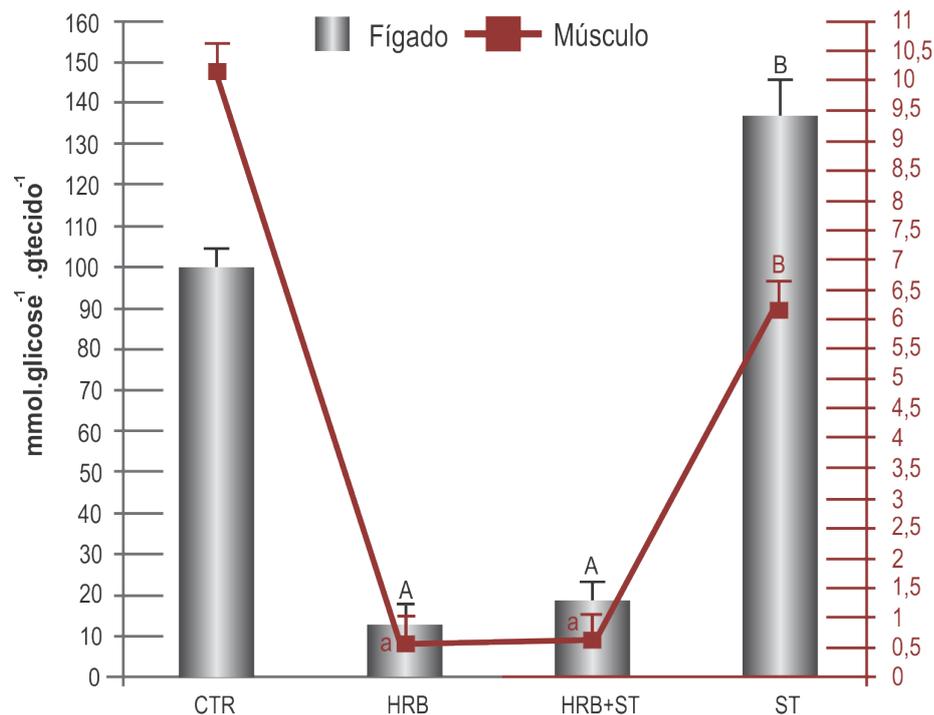
4.2 Herbimix

4.2.1 Etapa 1 – Intoxicação aguda

4.2.1.1 Tecidos hepático e muscular

O glicogênio no tecido do fígado teve um decréscimo ($P < 0,05$) tanto para o grupo exposto ao agroquímico ($\pm 87\%$) como para o grupo agroquímico + estresse ($\pm 81\%$), conforme descrito na figura 10. Os resultados após contaminação aguda, para o tecido muscular, também demonstraram um decréscimo ($P < 0,05$) nos níveis de glicogênio tanto para o grupo exposto ao agroquímico ($\pm 95\%$) como para o grupo agroquímico + estresse ($\pm 94\%$) (figura 10). A diminuição referente ao agroquímico + estresse pode estar relacionada apenas ao agroquímico, uma vez que o grupo estresse físico não teve seus índices reduzidos.

Figura 10 – Glicogênio no fígado e músculo, intoxicação aguda do Herbimix



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Na figura 10, acima, os valores de glicogênio nos tecidos de fígado e músculo expressos como média \pm erro padrão. O (A) indica a diferença significativa entre o controle e os tratamentos no fígado, e o (a) indica a diferença significativa entre o controle e os tratamentos no músculo, o B indica diferença significativa entre ST e os tratamentos HRB e HRB+ST para o músculo e o fígado. ANOVA seguido de vários testes de Tukey ($P < 0,05$ e $n=6$).

As variações observadas na figura 10 que demonstram um decréscimo do glicogênio hepático e muscular também foram encontradas por Gluszczak *et al.* (2005), mesmo que com outra espécie de peixe, e ainda para outros agroquímicos, como relatado por Matte (2013) no estudo com metil paration. No entanto, tem-se o estudo sobre respostas metabólicas do pacu exposto à concentração sub-letal de triclorfon, onde os tecidos hepáticos e musculares não demonstraram alterações nas reservas de glicogênio quando comparados ao controle (VENTURINI, 2010).

Parâmetros semelhantes foram descritos por Gluszczak *et al.* (2007) com o mesmo agroquímico, mas concentrações menores do que as usadas nesse estudo. Ainda foram observados resultados semelhantes com outro produto, mas com a mesma espécie de peixe (CRESTANI, 2004). Mostrando variabilidade encontrada nos resultados dos trabalhos, tem-se Salbego *et al.* (2010) analisando os efeitos do glifosato em Piava, que também demonstrou decréscimo de glicogênio no tecido hepático, mas tecido muscular não teve alteração. As alterações observadas no

fígado ficam evidentes em vários estudos do órgão submetido ao estresse químico, mostrando atividade catalítica aumentada e alterações histológicas graves, como degeneração e necrose (KOAKOSKI, 2012). Segundo Langiano e Martinez (2008), essas lesões são graves e podem impedir funções desempenhadas pelo órgão, pois diminui a área de tecido metabolicamente ativa, mas as alterações no fígado podem ser revertidas.

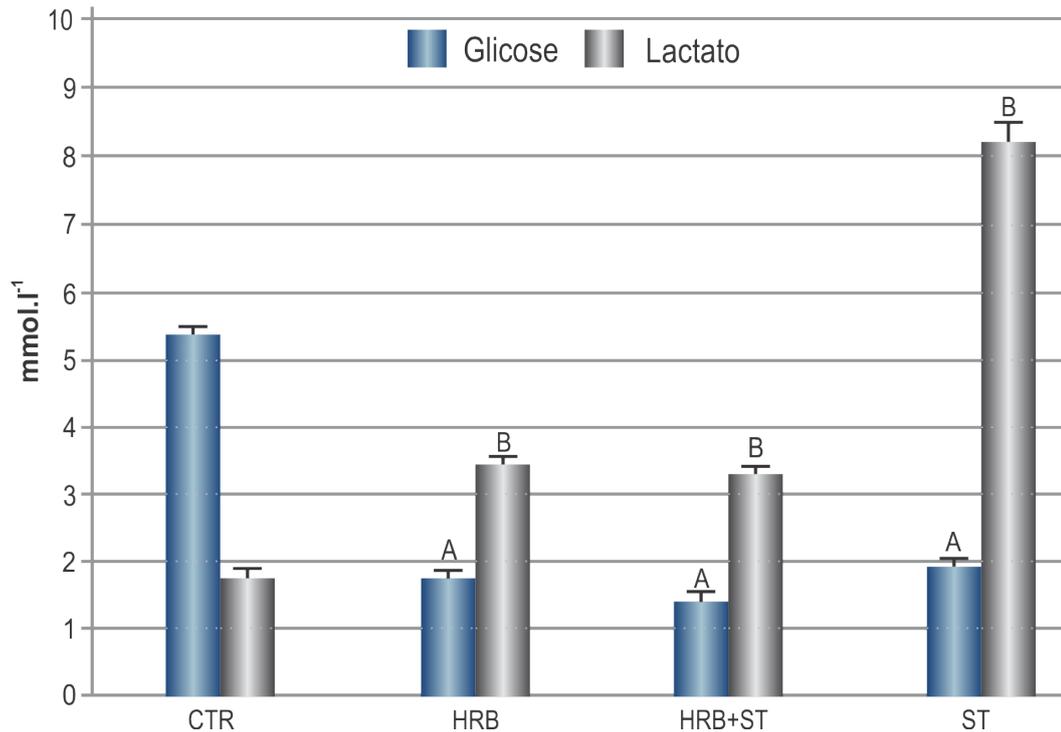
A constatação de Salbego *et al.* (2010) reforça a diferença de perfil metabólico entre os tecidos e da função de cada tecido, onde o fígado pode ter um maior consumo energético frente a um agroquímico, pois tem a função de detoxificar o químico, conseqüentemente alterando o metabolismo de carboidratos. Entretanto, a ação do estresse promove uma resposta diferenciada dos tecidos, que pode ser observada na Figura 10, onde ocorre o aumento ($P < 0,05$) dos valores do grupo ST quando comparados ao grupo HRB e ao HRB+ST em ambos os tecidos. O aumento do glicogênio pode estar associado ao aumento dos níveis de cortisol (KOASKOSKI *et al.*, 2014) em jundiás submetidos ao estresse, pois o aumento plasmático do cortisol tem sido reconhecido como a primeira resposta ao estresse. Estudos mostram que o metabolismo hepático sofre alterações devido ao cortisol exógeno, sendo o fígado o principal órgão alvo do cortisol, e um dos efeitos secundários do estresse são as alterações metabólicas (BARCELLOS *et al.*, 2012).

Assim, pode-se dizer que essas alterações podem estar relacionadas principalmente com as variadas concentrações e o tipo de agroquímicos testados (grupos químicos), e também ao tipo de estresse ao qual o animal foi submetido e ao tipo de tecido analisado.

4.2.1.2 Plasma

A glicose no plasma sanguíneo diminuiu ($P < 0,05$) no HRB ($\pm 67\%$), HRB+ST (75%) e ST (64%), sendo que o lactato plasmático teve um aumento significativo em todos os tratamentos, como pode ser observado na figura 11, a seguir.

Figura 11 – Glicose e lactato no plasma, intoxicação aguda ao Herbimix



Fonte: Elaborado pela autora, 2014.

Na figura 11, os valores de glicose e lactato no plasma, expressos como média \pm erro padrão. O (A) indica a diferença significativa entre o controle e os tratamentos na glicose e o (B) indica a diferença significativa entre o controle e os tratamentos para o lactato. ANOVA seguido de vários testes de Tukey ($P < 0,05$, $n=6$).

A redução da glicose e o aumento do lactato no plasma indicam uma via anaeróbia para restaurar a homeostase após o estresse sofrido. No estudo que mostra a diminuição da glicose e o lactato inalterados, Venturini (2010) sugere que não houve hipóxia celular, pois levaria ao metabolismo anaeróbico e, conseqüentemente, o lactato no sangue aumentaria, como o relatado neste estudo. Já Crestani (2004) observou que a glicose e lactato aumentaram quando o jundiá foi exposto ao clomazone. A autora relata que a hiperglicemia deve estar associada à gliconeogênese por outra rota metabólica que não a hepática, transformando lactato em glicose e, assim, aumentando os níveis deste metabolito no plasma.

4.2.2 Etapa 2- Recuperação

4.2.2.1 Tecido hepático e muscular

Após o período em que os peixes foram submetidos à recuperação, ou seja, ficaram na água livre do agroquímico, o glicogênio no tecido hepático teve um aumento significativo em 45 dias no grupo exposto ao agroquímico e no grupo do agroquímico+estresse, já no tecido muscular a recuperação significativa das reservas do glicogênio ocorreu somente no tratamento agroquímico+estresse, e no tratamento com agroquímico o aumento foi apenas numérico, como mostra a Tabela 6, a seguir.

Tabela 6- Glicogênio no fígado e músculo, períodos de recuperação ao herbimix

GLICOGÊNIO NO FÍGADO					
		T1(CTR)	T2(HRB)	T3(HRB+ST)	T4(ST)
Exposição	96 horas	99,21±27,17	13,01±2,17	19,22±3,40	134,2±47,16
	96 horas	99,21±27,17	13,01±2,17	19,22±3,40	134,2±47,16
Recuperação	45 dias	151,89±22,10	153,10±17,64 a	116,08±24,58 a	120,75±11,02
	90 dias	125,46±24,70	106,91±22,98 a	151,01±24,13 a	131,99±32,77
	90 dias	125,46±24,70	106,91±22,98 a	151,01±24,13 a	131,99±32,77
	135 dias	107,38±15,29	55,04±5,15	94,08±12,94	78,40±11,47
GLICOGÊNIO NO MÚSCULO					
		T1(CTR)	T2(HRB)	T3(HRB+ST)	T4(ST)
Exposição	96 horas	10,09±2,04	0,54±0,09	0,60±0,20	6,19±2,69
	96 horas	10,09±2,04	0,54±0,09	0,60±0,20	6,19±2,69
Recuperação	45 dias	8,30±2,55	7,67±3,50	8,86±2,35 a	14,55±3,08
	90 dias	9,59±2,51	3,46±0,60	3,11±0,94	3,05±1,15
	90 dias	9,59±2,51	3,46±0,60	3,11±0,94	3,05±1,15
	135 dias	7,96±1,86	3,14±0,92	1,61±0,50	15,59±3,45

Fonte: Elaborada pela autora, 2014.

Conforme a Tabela 6, o glicogênio ($\text{mmol.glicose}^{-1}.\text{gtecido}^{-1}$) é expresso como média \pm S.E.M. Nela, o **a** minúsculo indica a diferença estatística entre a intoxicação aguda e os períodos de recuperação (coluna). ANOVA, seguido por vários testes de Tukey ($P < 0,05$, $n=6$).

O glicogênio é uma forma importante de armazenamento de energia, fornece combustível para o metabolismo de carboidratos mais facilmente que o tecido adiposo, por isso, é importante a recuperação do animal para que mantenha seu equilíbrio energético. O estudo mostra capacidade de recuperação metabólica de

ambos tecidos, no entanto o fígado mostrou recuperação com valores acima do grupo controle.

Testes com triclorfon e pacu mostraram que sete dias de recuperação foram suficientes para o restabelecimento do glicogênio no fígado ($P < 0,05$), que havia sofrido um aumento numérico desse parâmetro, não sendo suficientes para o tecido muscular (VENTURINI, 2010). Em jundiás expostos ao metil paration, os níveis de glicogênio hepático permaneceram alterados após 180 dias de recuperação; já o tecido muscular recuperou estas reservas em 90 dias. No mesmo estudo, no grupo que foi submetido ao estresse físico, 45 dias foram suficientes para a recuperação das reservas de glicogênio muscular, enquanto usando tebuconazole observou no fígado recuperação dos tratamentos (intoxicação aguda+ estresse) e só submetido ao (estresse físico) em 45 dias, e para o tecido muscular os 180 dias não foram suficientes para recuperá-lo (MATTE, 2013).

4.2.2.2 Plasma

A glicose plasmática demonstrou um decréscimo significativo nos três tratamentos HRB, HRB+ST e ST a que os animais foram submetidos, sendo que nos 45 dias em que ficaram na água livre de agroquímico os valores foram restabelecidos, $P < 0,05$, conforme representados (Tabela 7).

Tabela 7 – Glicose no plasma, intoxicação aguda e períodos de recuperação ao herbimix

		GLICOSE NO PLASMA SANGUÍNEO			
		T1(CTR)	T2(HRB)	T3(HRB+ST)	T4(ST)
Exposição	96 horas	5,36±0,76	1,78±0,04	1,38±0,31	1,93±0,43
Recuperação	45 dias	4,23±0,32	5,64±0,47 a	4,50±0,07 a	5,28±0,51 a
	90 dias	4,30±0,43	5,58±0,22 a	5,37±0,06 a	6,22±0,73 a
	135 dias	3,15±0,10	6,31±0,42 a	1,18±01,31	4,13±0,53

Fonte: Elaborada pela autora, 2014.

Conforme a Tabela 7, a glicose (mmol.L^{-1}) é expressa como média \pm S.E.M. Nela, o **a** minúsculo indica a diferença estatística entre a intoxicação aguda e os períodos de recuperação(coluna). ANOVA, seguido por vários testes de Tukey ($P < 0,05$), $n=6$.

Na Tabela 8, a seguir, pode-se observar um aumento significativo do lactato no HRB e no HRB+ST, respondendo da mesma forma no tratamento submetido apenas ao estresse físico. Os valores de lactato seguiram aumentando de maneira significativa durante 45, 90 e 135 dias de recuperação.

Tabela 8 – Lactato no plasma, intoxicação aguda e períodos de recuperação ao herbimix

LACTATO NO PLASMA SANGUÍNEO					
		T1(CTR)	T2(HRB)	T3(HRB+ST)	T4(ST)
Exposição	96 horas	1,74±0,03	3,45±0,11	3,30±0,08	8,31±0,22
Recuperação	45 dias	2,88±0,28	9,39±0,43 a	9,40±0,23 a	8,41±0,84
	90 dias	4,90±0,71	8,11±0,14 a	8,98±0,17 a	5,78±1,24
	135 dias	7,05±1,42	10,14±0,25 a	8,63±2,42 a	5,60±0,47

Fonte: Elaborada pela autora, 2014.

Conforme a Tabela 8, o lactato (mmol.L^{-1}) é expresso como média \pm S.E.M. Nela, o **a** minúsculo indica a diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle. ANOVA, seguido por vários testes de Tukey ($P < 0,05$), $n=6$.

No estudo com clomazone e jundiá, avaliando o período de recuperação dos parâmetros hematológicos, Crestani (2004) observou que 96 horas não foram suficientes para que a glicose tivesse seus valores recuperados e que o lactato sanguíneo permaneceu com valores elevados, mostrando tempo insuficiente até 192 horas pós-contaminação. Em outro estudo, este realizado por Venturini (2010), 14 dias de recuperação foram suficientes para o retorno dos níveis de lactato no plasma, porém para a glicose, a autora relata que este tempo de recuperação não foi suficiente.

Frente ao relato de diferentes autores pode-se dizer que o tempo de recuperação está relacionado diretamente com o parâmetro plasmático analisado, pois Koakoski *et al.*, (2014), usando herbimix, em jundiás, observou que 180 dias de recuperação não foram suficientes para o retorno dos níveis de cortisol a valores semelhantes ao controle.

Sendo assim, observa-se que 45 dias foram suficientes para que a glicose disponível no sangue se restabelecesse após o estresse sofrido; já o lactato continuou aumentando sua concentração até 135 dias em água livre de agroquímico, sugerindo resposta ao estresse químico, visando uma via alternativa de suporte energético, provavelmente suprimindo a necessidade de glicose no sangue.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Há uma grande disparidade na condução dos trabalhos que avaliam o efeito da intoxicação aguda por agroquímicos sobre alterações fisiológicas em peixes. A divergência de resultados observada entre os diferentes estudos, incluindo o presente, pode ser atribuída a vários fatores, dentre os quais podem ser citados: diferentes espécies de peixes, diferentes agroquímicos, diferentes concentrações, diferentes períodos experimentais, além de praticamente não existir estudo sobre períodos de recuperação. Em função dos fatores citados, que podem influenciar as respostas, torna-se difícil a comparação entre os diversos trabalhos.

Porém, mesmo com a diversidade de protocolos experimentais, pode-se observar que o uso de agroquímicos promove alterações no metabolismo de carboidratos nos diferentes tecidos. No tecido hepático, a ação de ambos os agroquímicos parece rápida e agressiva, confirmada pela ação drástica nos níveis de glicogênio. Assim como observado no tecido hepático, também ocorreu um decréscimo do glicogênio no tecido muscular.

Quanto aos parâmetros plasmáticos, a glicose diminuiu em ambos os agroquímicos e o lactato aumentou, sugerindo uma situação de hipóxia que pode ter conduzido a utilização da via anaeróbia para a degradação da glicose, resultando num aumento da produção de ácido láctico.

Pode-se também observar que todos os tecidos sofrem alterações frente ao agroquímico ou ao estresse, ou na associação de ambos. Entretanto, o tempo de recuperação é diferenciado, o que reforça a diferença do perfil metabólico de cada tecido.

Os dados obtidos trazem novas perspectivas a serem estudadas para que se possa elucidar o efeito de diferentes tipos de estresse no metabolismo. Estudos de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, assim como a determinação do efeito desses agentes estressores sobre reservas de proteínas e lipídios, poderiam complementar os resultados encontrados neste estudo.

6 CONCLUSÕES

- ✓ O jundiá (*Rhamdia quelen*) apresentou resposta fisiológica frente à intoxicação aguda dos agroquímicos, podendo ser usado como bioindicador ambiental.
- ✓ A exposição aguda ao Glifosato e Herbimix altera os níveis de glicose e lactato sanguíneo.
- ✓ Os peixes expostos aos agroquímicos testados mobilizaram reservas de glicogênio dos tecidos hepático e muscular.
- ✓ O período de recuperação de 45 dias foi suficiente para que o glicogênio, glicose e lactato na maioria dos tecidos e tratamentos, voltassem aos valores pré-exposição.
- ✓ A contaminação química e o estresse alteraram o metabolismo de carboidratos do jundiá, sendo que o estresse interfere diretamente nos metabólitos plasmáticos.
- ✓ Resposta do estresse foi alterada pela ação dos agroquímicos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ - ADAPAR. **Herbimix**. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/file/defis/dfi/bulas/herbicidas/herbimix_sc>. Acesso em: 5 mar. 2013.

AGROCOMÉRCIO. **Piscicultura**: Jundiá (*Rhamdia quelen* e *R.sapo*). [s.d.]. Disponível em: <<http://www.agrocomercio.com.br/site/piscicultura.php?peixe=13>>. Acesso em: 7 mar. 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15499. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Métodos de ensaios com peixes**. São Paulo: ABNT, 2007.p. 21.

BARCELLOS, L. J. G. A piscicultura na região, no estado, no país e no mundo. In: _____; FAGUNDES, M. (Orgs.). **Policultivo de jundiás, tilápias e carpas**: uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2012.p. 27-36.

_____; SOUZA, S. M. G.; WHOEHL, V. M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências. In: _____; FAGUNDES, M. (Orgs.). **Policultivo de jundiás, tilápias e carpas**: uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2012.p.210-256.

_____; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FIOREZE, I.; RODRIGUES, L. B.; SOSO, A. B.; RITTER, F.; CONRAD, J.; CERICATO, L.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Ramdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) and hormonal and biochemical change safter acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1465-1469, 2003.

_____; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; SANTOS DA ROSA, J. G.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhandia quelen*) stress response. **Aquaculture**, v. 288, n. 1, p. 51-56, 2009.

_____; WOEHL, V. M.; WASSERMANN, G. F.; QUEVEDO, R. M.; ITZÉS, I.; KRIEGER, M. H. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference. In: *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American Catfish. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 2, p. 121-123, 2001.

BECKER, A. G.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; LORO, V. L.; SANTOS, D. R.; REICHERT, J. M.; BALDISSEROTTO, B. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1734-1739, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária -- ANVISA. **Portal**. 3 jul. 2009. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/crqe>>. Acesso em: mar. 2013.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente — CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 53, 18 mar. 2005, p. 58-63. Alterada pela Resolução nº 410/2009 e pela nº 430/2011. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2014.

BRAUSCH, M. J.; SMITH, N. P. Toxicity of three polyethoxylated tallow amine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 2, p. 217-221, 2007.

BUCHELI, T. D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, n. 25, p. 201-268, 1995.

CERICATO, L.; NETO, J. G. M.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FINCO, J.; EROSA, J. G. S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; ANZILIERO, D.; BARCELLOS, L. J. G. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C, v. 148, p. 281-286, 2008.

_____; MACHADO, J. G. N.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ROSA, J. G. S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; MARQUEZE, A.; BARCELLOS, L. J. G. Responsiveness of the interrenal tissue of jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology & Pharmacology**, v. 149, p. 363–367, 2009.

CRESTANI, M. Efeitos do herbicida clomazone sobre parâmetros metabólicos e antioxidantes em jundiás (*Rhamdia quelen*). 2004. 95 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Santa Maria, RS, 2004.

_____; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v. 67, p. 2305-2311, 2007. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/chemosphere.available>>.

DORNFELD, C. B.; MASUTTI, M. B.; ANDRADE, C. A.; ALMEIDA, C. A.; SILVERIO, P. F. Caracterização ecotoxicológica do sedimento da Represa do Lobo (Itarapina-Brotas, SP) e seus tributários. In: ESPINDOLA, E. L. G. (Ed.). **Impactos ambientais em recursos hídricos: causas e consequências**. São Carlos: Rima, 2001. p. 245-259.

GLUSCZAK, L.; MIRAN, D. S.; CRESTANI, M.; BRAGA DA FONSECA, M.; PEDRON, F. de A.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on

acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 2, p. 237-241, 2005.

_____; MIRON, D. S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 4, p. 519-524, 2007. DOI: 10.1016/j.cbpc.2007.06.004.

GUEDES, D. S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia ssp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae)**. 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1980.

GURGEL, H. C. B. **Aspectos do comportamento biológico de *Rhamdia branneri* Haseman, 1911 (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelididae)**. 1979. 53 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1979.

KOAKOSKI, G. Resposta de cortisol e danos histopatológicos em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas ao herbicida roundup ready. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, 2012.

_____; KREUTZ, I. C.; QUEVEDO, R. M.; FERREIRA, D.; OLIVEIRA, T. A.; ROSA, J. G. S.; ABREU, M. S.; GUSSO, D.; MARQUZE, A.; GIACOMINI, A. C. V.; FAGUNDES, M.; BRACELLOS, L. J. G. Agrichemical schronically inhibit the cortisol response to stress in fish. **Chemosphere**, v. 112, p.85-91, 2014.

KREUTZ, I. C.; BRACELLOS, L. J. G.; SILVA, O. T.; ANZILIERO, D.; MARTINS, D.; LORENSON, M.; MARTENINGHE, A.; SILVA, B. L. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1050-1055, 2008.

_____; _____. FAGUNDES, M. (Orgs.) **Policultivo de jundiás, tilápias e carpas: uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense**. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2012.

_____. Investigation of acute toxicity of pesticides on jundiá (*Ramdia quelen*), a South American catfish. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1050-1055, 2008.

LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 222-231, 2008.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: Articulação Nacional de Agroecologia (ANA) / Rede Brasileira de Justiça Ambiental (RBJA), 2011.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos, **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MATTE, V. L. **Efeito da ação de agroquímicos e do estresse sobre o metabolismo de carboidratos de jundiás (*Rhamdia quelen*)**. 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais) – Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, Centro Universitário La Salle - UNILASALLE, Canoas, RS, 2013.

MEURER, S.; ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do Alto Rio Uruguai. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 12, São Paulo, SP, 1997. **Anais...** São Paulo: SBI, 1997. p. 29.

MIRON, D. S.; PRETTO, A.; CRESTANI, M.; GLUSCZAK, L.; SCHETINGE, M. R.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M. Biochemical effects of clomazone herbicida on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 74, n. 1, p. 1-5, 2008.

MÖLLERKE, R. O.; NOLL, I. B.; SANTO, M. A. B. E.; NORTE, D. M. Níveis de arsênio total como indicador biológico, na avaliação da qualidade do pescado (*Leporinus obtusidens* e *Pimelodus maculatus*) do lago Guaíba em Porto Alegre, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n. 2, p. 117-121, 2003.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.

MOURA, E. E. S. **Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes**. 58f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MOURA, M. A. M.; FRANCO, D. A. S.; MATALLO, M. B. Impactos de herbicidas sobre os recursos hídricos. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 142-151, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br>>. Acesso em: 15 jul. 2013.

NARAHARA, M. Y.; GODINHO, H. M.; ROMAGOSA, E. Estrutura da população de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 12, n. 3, p. 123-137, 1985.

ORUÇ, E. Ö.; ÜNER, N. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. **Environmental Pollution**, v. 105, p. 267-272, 1999.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and Histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla Anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety** (journal), n. 53, p. 331-347, 2002.

RECENA, M. C. P.; PIRES, D. X.; CALDAS, E. D. Acute poisoning with pesticides in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 357, n. 1-3, p. 88-95, 2006.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 66, p. 37-40, 2001.

SALBEGO, J.; PRETTO, A.; GIODA, C. R.; DE MENEZES, C. C.; LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V. L. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Ieporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 740-745, 2010. DOI 10.1007/s00244-009-9464-y.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; GAMON, M.; ANDREAU, E. Organophosphorus diazinon induced toxicity in the fish *Anguilla Anguilla* L. Comparative Biochemistry and Physiology – part C. **Comparative Pharmacology and Toxicology**, v. 103, n. 2, p. 351-356, 1992.

_____; _____; FERNÁNDEZ, C.; ANDREAU, E. Liver energy metabolism of *Anguilla Anguilla* after exposure of fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, p. 168-175, 1998.

SAPOLSKY, R. M. Stress in the wild. **Scientific American**, n. 262, p. 106-113, Jan. 1990.

SCHLENK, D. Pesticide biotransformation in fish. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Elsevier, Amsterdam, v. 6, p. 171-190, 2005.

SCHIMDT- NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. São Paulo: Santos, 2002. cap. 5, p. 169-178.

SEIXAS FILHO, J. T. Uma revisão sobre o papel do carboidrato e da proteína no metabolismo de peixes com hábitos alimentar carnívoro e onívoro. **Augustus**, Rio de Janeiro, Centro Universitário Augusto Motta, v. 9, n. 18, p. 1-72, jan./jun. 2004.

SILVA, L. B. da; BARCELLOS, L. J. G.; QUEVEDO, R. M.; SOUZA, S. M. G. de; KESSLER, A. de M.; KREUTZ, L. C.; RITTER, F.; FINCO, J. A.; BEDIN, A. C. Introduction of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) increases the productivity of carp polyculture in southern Brazil. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 542-551, 2008.

SILVA, M. P.; PERALBA, M. D. R.; MATTOS, M. L. T. Determinação de glifosato a ácido aminometilfônico em águas superficiais do arroio passo do pilão. **Pesticidas:Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 19-28, 2003.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei Pimelodidae)**. 1996. 156 p. (PhD Thesis) – Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.

SOUZA, C. R.; FAVARO, J. L. Questionamentos sobre a destinação final de embalagens vazias de agrotóxicos. **Revista Eletrônica Ciências Sociais e Aplicadas Lato Sensu**, v. 2, n. 1, jul. 2007. Disponível em: <<http://www.unicentro.br>>. Acesso em: 15 maio 2012.

STRANDBERG, M. T.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Field effects of simazine at lower trophic levels – a review. **Science of the Total Environment**, v. 296, n. 1-3, p. 117-137, Sept. 2002.

VENTURINI, F. P. **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, holmberg, 1887) exposto a concentração sub-letal de triclorfon e recuperação**. 2010. 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2010.

WEIS, M. L. C. **Interpretação da idade e cálculo da curva de crescimento do jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) do banhado de Santa Catarina, RS**. 1980. 93 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1980.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-625, 1997.