

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**CRESCIMENTO E PARÂMETROS
TOXICOLÓGICOS EM JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*) EXPOSTOS A UMA FORMULAÇÃO
COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-D**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Milene Braga da Fonseca

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**CRESCIMENTO E PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A UMA
FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-D**

Por

Milene Braga da Fonseca

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Vania Lucia Loro
(Orientadora)

Santa Maria, RS, Brasil
2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado

**CRESCIMENTO E PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM JUNDIÁS
(*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO
HERBICIDA 2,4-D**

Elaborada por
Milene Braga da Fonseca

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Vania Lucia Loro
(Presidente/Orientador)

Bernardo Baldisserotto, Dr (UFSM)

Luis Antônio de Avila, Dr (UFSM)

Santa Maria, 27 de setembro de 2007.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, SOLAGEM, por ter me dado a vida e ter lutado com toda a garra por ela, pelas noites em claro, pelo entusiasmo e amor.

Ao meu pai, LAURINDO, meus avós, GLICÉRIO, ARNO e IRENA, pois onde estiverem essa vitória também é de vocês (in memoriam).

À minha avó GENOÁ e demais familiares pela compreensão às minhas faltas.

Ao meu amor, ADEJALTO, pois desde que chegaste à minha vida trouxe uma maré de tranquilidade e alegrias.

À minha “segunda mãe”, VANIA LUCIA LORO, pois me fez crescer e enfrentar os obstáculos de frente.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter me dado a oportunidade de viver e chegar até aqui, conhecendo todas essas pessoas maravilhosas que cruzaram o meu caminho.

A toda minha família pelo incentivo, carinho e compreensão, muito obrigada.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Vania Lucia Loro, pela oportunidade, pelo conhecimento, pelo tempo dedicado, principalmente pela lição de vida, sempre mostrando a profissional competente e amiga nas horas mais difíceis, obrigada chefinha.

À minha grande amiga Charlene, mais do que colega, uma companheira fiel e incansável, muito obrigada por tudo.

À inesquecível Alexandra, parceira para todas as horas, sempre disposta ao que der e vier, muito obrigada de todo o meu coração.

À amiga Bibiana, demorei um pouco pra te conhecer, mas quando conheci de verdade roubaste um pedacinho do meu coração, obrigada pelo companheirismo.

À querida Alice, sempre dedicada e disposta, muito obrigada pela ajuda e pela amizade.

À amiga Lissandra, no começo foi meio difícil, tivemos alguns contratempos, mas posso dizer que hoje tu fazes parte do meu coração, muito obrigada pelas colaborações sempre valiosas.

Às muito queridas Bárbara e Roberta, cada uma de um jeito especial consegue alegrar a todos, obrigada pela ajuda.

Às colegas Denise, Aracéli e Rita, muito obrigada pela colaboração e amizade e carinho.

À UFSM, ao PPGBTOX, aos demais professores, ao CNPq, à todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	06
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	09
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1.INTRODUÇÃO.....	14
2.OBJETIVOS.....	15
2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1. CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	16
3.2. HERBICIDA 2,4-D.....	17
3.2.1. TOXICIDADE DO 2,4-D EM PEIXES.....	18
3.3. <i>Rhamdia quelen</i> (JUNDIÁ).....	19
3.4. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO.....	20
3.5. INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS.....	20
3.6. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	21
4.RESULTADOS.....	23
4.1. MANUSCRITO 1: Long time 2,4-D exposure on teleostean fish silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>): evaluate of growth, some metabolic and enzymatic parameters. Milene Braga da Fonseca, Alexandra Pretto, Charlene Cavalheiro de Menezes, Bibiana Silveira Moraes, Bárbara Clasen, Vânia Lucia Loro.....	23
4.2. MANUSCRITO 2: 2,4-D herbicide affect toxicological and metabolic parameters of fish <i>Rhamdia quelen</i> . Milene Braga da Fonseca, *Vânia Lúcia Loro, Bárbara Clasen, Alexandra Pretto, Alice Raabe and Bernardo Baldisserotto	41

5.DISSCUSSÃO.....	58
6.CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO 1:

FIGURA 01: Catalase activity in the liver of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to 2,4-D (90 days). Values are means \pm SD (n=8). Data are expressed as $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ * Indicates difference between groups and control values ($P \leq 0.05$).

FIGURA 02: Protein and glucose levels of the mucus layer of *Rhamdia quelen* after chronic exposure (90 days) to 2,4-D herbicide. Data represent the mean \pm SD (n=8). * indicates significant difference from control ($P \leq 0.05$).

FIGURA 03: TBARS levels (nmol MDA mg^{-1} of protein) in brain, liver and white muscle of *Rhamdia quelen* exposed to 0.2 and 0.4 mg L^{-1} 2,4-D for 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=8). * Indicates difference between groups and control values ($P \leq 0.05$).

MANUSCRITO 2:

FIGURA 01: Catalase activity in the liver of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to 2,4-D (96 hours). Values are means \pm SD (n=8). Data are expressed as $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ * Indicates difference between groups and control values ($P \leq 0.05$).

FIGURA 02: TBARS levels (nmol MDA mg^{-1} of protein) in brain, liver and white muscle of *Rhamdia quelen* exposed to 0.2 and 0.4 mgL^{-1} 2,4-D for 96 hours. Data represent the mean \pm SD (n=8). * Indicates difference between groups and control values ($P \leq 0.05$).

FIGURA 03: Protein and glucose levels of the mucus layer of *Rhamdia quelen* after chronic exposure (96 hours) to 2,4-D herbicide. Data represent the mean \pm SD (n=8). * indicates significant difference from control ($P \leq 0.05$).

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1:

TABELA 01: Growth parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after exposure (90 days) to 2,4-D herbicide at 0.0 (Control), 0.5 or 2.0 mg L⁻¹. * Indicates (In line) significant difference from control ($P \leq 0.05$).

TABELA 02: Hepatic, white muscle, kidney and blood metabolites of *Rhamdia quelen* exposed to different concentrations (mgL⁻¹) of 2,4-D for 90 days. Glucose and lactate were expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ tissue. Glycogen was expressed in $\mu\text{mol glycosyl-glucose g}^{-1}$ tissue. Protein was expressed as mg g⁻¹ tissue. Data represent the mean \pm SD (n=8). * Indicates difference between groups and control values ($P \leq 0.05$).

MANUSCRITO 2:

TABELA 01: Metabolic parameters ($\mu\text{mol g}^{-1}$ tissue or ml plasma) in liver, white muscle, kidney and blood of *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D for 96 hours. * Indicates difference between groups and control values ($P \leq 0.05$).

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

CRESCIMENTO E PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-D

Autora: Milene Braga da Fonseca

Orientadora: Vania Lucia Loro

Data e local de defesa: Santa Maria, 27 de setembro de 2007.

Neste estudo, jundiás (*Rhamdia quelen*) foram expostos a uma formulação comercial do herbicida 2,4-D: 0,0 (controle), 0,5 ou 2,0 mg L⁻¹ por 90 dias ou 96 horas. Após os períodos experimentais foram avaliados o crescimento (90 dias), composição do muco, parâmetros metabólicos, formação de TBARS em diferentes tecidos e atividade da catalase. *R. quelen* apresentou redução em alguns parâmetros do crescimento como média da massa final que reduziu 37% e 45% respectivamente para 0,5 ou 2,0 mg L⁻¹, comprimento total do corpo de 15% para a concentração 2,0 mg L⁻¹. O ganho de massa diário reduziu 55% e 58% para ambas as concentrações testadas. O crescimento específico diminuiu de 1,20 (controle) para 0,72 e 0,60 respectivamente para ambas as concentrações testadas. O fator de condição reduziu 22% e 12% para as concentrações de 0,5 ou 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Os jundiás apresentaram alterações no muco como o decréscimo do açúcar solúvel para ambas as concentrações testadas e aumento nos níveis de proteína em 2,0 mg L⁻¹ do herbicida após 90 dias e 96 horas de exposição. Os peixes expostos ao herbicida 2,4-D a 0,5 ou 2,0 mg L⁻¹ apresentaram redução nos níveis de glicogênio e proteína no tecido do fígado após 90 dias de exposição. Mas este tecido apresentou aumento nos níveis de glicose e lactato para ambas as concentrações testadas. O fígado de *R. quelen* após 96 horas de exposição apresentou aumento nos níveis de glicogênio e redução nos níveis de lactato e proteína em ambas as concentrações testadas, mas não teve diferença

significativa nos valores de glicose. O tecido muscular após 90 dias de exposição ao 2,4-D mostrou redução nos valores de glicogênio e proteína na concentração mais alta testada e decréscimo na glicose para ambas as concentrações de 2,4-D, porém os níveis de lactato aumentaram em ambas as concentrações testadas. Após 96 h de exposição o músculo apresentou redução nos níveis de glicogênio e lactato quando comparado com os valores do controle. O tecido do rim mostrou redução nos valores de glicogênio e glicose, mas um aumento no lactato para ambas as concentrações de 2,4-D e os níveis de proteína não estiveram alterados quando comparados com os valores de controle. Este tecido após 96 h de exposição a 0,5 ou 2,0 mg L⁻¹ do herbicida mostraram decréscimo nos níveis de lactato, mas os valores de glicogênio, glicose e proteína não estiveram alterados. Os metabólitos do plasma apresentaram redução nos níveis de lactato e proteína para ambas as concentrações testadas. A glicose não esteve alterada após 90 dias de exposição. Depois de 96 h o plasma mostrou redução nos níveis de lactato, mas glicose e proteína não tiveram alteração significativa quando comparadas com os valores do controle. A atividade da catalase hepática mostrou aumento para ambos os experimentos em ambas as concentrações testadas. A formação de TBARS após 90 dias de exposição ao 2,4-D mostrou decréscimo no tecido do fígado, mas aumento no músculo branco. TBARS no cérebro não esteve alterado neste experimento. Após 96 h de exposição, os níveis de TBARS aumentaram no tecido do fígado e não tiveram alteração nos tecidos do cérebro e músculo branco quando comparado com os valores do controle. Os dados demonstram que o herbicida 2,4-D altera alguns parâmetros do crescimento após longo tempo de exposição. Em adição, este herbicida causa alterações nos parâmetros metabólicos e estresse oxidativo após 90 dias e 96 horas de exposição.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*, crescimento, metabolismo, catalase, TBARS, 2,4-D, herbicida.

ABSTRACT

Master Dissertation

Biological Sciences: Toxicological Biochemistry Post-Graduation

Universidade Federal de Santa Maria

**GROWTH AND TOXICOLOGICAL PARAMETERS OF SILVER CATFISH
(*Rhamdia quelen*) EXPOSED TO COMMERCIAL FORMULATION TO 2,4-D
HERBICIDE**

Author: Milene Braga da Fonseca

Adviser: Vania Lucia Loro

Place and date: Santa Maria, September 27, 2007

In this study, silver catfish (*Rhamdia quelen*) were exposed to commercial formulation to 2,4-D herbicide at 0.0 (control) 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ for 90 days or 96 hours. After the exposure were evaluated the growth, mucous layer composition, metabolic parameters, TBARS formation in different tissues and liver catalase activity. *R. quelen* showed reduction on some growth parameter as final mean mass that decrease on 37% and 46% respectively to 0.5 or 2.0 mg L⁻¹, total body length to 15 % to high concentration tested. Daily mass gain reduced to 55% and 58% to both concentrations tested. The specific growth decrease of 1.20 (control) to 0.72 and 0.60 respectively to both concentrations tested. The factor of condition reduced 22% and 12% for 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D concentration. The silver catfish showed alterations on mucous layer contents as decrease of soluble sugar at both concentrations tested and increase of protein levels at 2.0 mg L⁻¹ to herbicide concentration after 90 days and 96 hours of exposure. Fish exposed to 2,4-D herbicide at 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ presented glycogen reduction and protein level in the liver tissue after 90 days of exposure. But this tissue showed increase in lactate and glucose levels at both concentrations tested. The liver tissue of *R. quelen* after 96 h of exposure showed increased to glycogen level and reduced to lactate and protein levels to both concentrations tested, but were not significantly difference to glucose values. The muscle tissue after 90 days of exposure to 2,4-D showed reduced to glycogen and protein values at high concentration tested and decreases to

glucose at both 2,4-D concentrations. Lactate levels were increased to 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ to 2,4-D herbicide. After 96 h of exposure this tissue presented reduced to glycogen and lactate levels, but the glucose and protein values was not altered as compared to control values. The kidney tissue showed decrease to glycogen and glucose values, but lactate was increased at both concentrations of 2,4-D and protein levels were not altered as compared to control values. This tissue after 96 h of exposure to 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ of herbicide showed decrease to lactate levels, but glycogen, glucose and protein values was not altered. The plasm metabolites presented reduction of lactate and protein levels at both concentrations tested. Glucose was not altered after 90 days of exposure. After 96 h the plasm showed reduction in lactate level, but glucose and protein was not significantly alteration as compared to control values. Catalase activity showed enhanced to both experimentation and both concentrations, values as compared to control. TBARS formation after 90 days to 2,4-D exposure showed decrease to liver tissue, but enhanced in white muscle. TBARS in brain tissue was not altered in this experimentation. After 96 h of 2,4-D exposure TBARS levels enhanced to liver tissue and was not alteration in the brain and white muscle tissue as compared to control values. Data demonstrated that 2,4-D herbicide alter the some growth parameters after long time exposure. Besides, this herbicide causes alterations on metabolic parameter and oxidative stress after 90 days and 96 hours of exposure.

Keywords: *Rhamdia quelen*, growth, metabolism, catalase, TBARS, 2,4-D, herbicide.

1 - INTRODUÇÃO

A manipulação descuidada de pesticidas pode levar a uma contaminação acidental de sistemas aquáticos causando efeitos prejudiciais a diferentes organismos que habitam esses meios, dentre eles as populações de peixes (Jiraungkoorskul et al., 2002). A presença de herbicidas, classe de pesticidas que controlam pragas vegetais, no ambiente aquático é consequência do seu uso no controle das plantas daninhas e vegetação rasteira, porém pouco se conhece sobre a toxicidade destes produtos em organismos aquáticos não alvo como os peixes (Jyothi & Narayan, 1999). Os efeitos tóxicos dos diferentes pesticidas empregados no meio agrícola em peixes variam amplamente, e ocorrem devido à absorção passiva destas substâncias tóxicas através das brânquias e pela superfície do corpo (Szarek, 2000).

Entre os herbicidas utilizados nas culturas agrícolas do RS, o 2,4-diamin (2,4-D) é utilizado devido ao seu baixo custo e boa seletividade. De acordo com Gallagher & Di Giulio (1991), o herbicida 2,4-D em baixas concentrações pode ser considerado pouco tóxico para peixes. Porém, estudos recentes com a espécie nativa do RS *Leporinus obtusidens* mostram que o peixe pode reter até 30% deste composto (Fonseca et al., 2007).

Considerando a importância de elucidar os mecanismos de toxicidade de pesticidas utilizados em agricultura sobre peixes nativos de nossa região, escolhemos como modelo experimental o jundiá. O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie endêmica da região Sul da América do Sul, podendo sobreviver ao frio do inverno da região e obter um ótimo crescimento no verão. Além disso, possui boa aceitação comercial, sendo assim, um peixe com um bom potencial para o cultivo (Barcellos et al., 2003).

Quando o organismo é afetado por uma substância tóxica, ocorrem respostas fisiológicas e bioquímicas na tentativa de se obter uma adaptação ou desenvolvimento de toxicidade. As respostas bioquímicas normalmente são mais sensíveis, portanto as primeiras passíveis de determinação (Begum, 2004). A presença de herbicidas na água pode causar alterações fisiológicas em peixes, as quais podem ser avaliadas através dos parâmetros metabólicos,

tais como níveis de lactato, glicose, proteína e glicogênio em diferentes tecidos (Sancho et al., 1998; Jyoti & Naraiian, 1999, Crestani et al.; 2006). Alterações metabólicas no tecido hepático são freqüentemente encontradas em peixes expostos a diferentes componentes tóxicos encontrados na água, já que o fígado é o órgão central responsável pela detoxificação do organismo (Oruç & Üner, 1999).

A contaminação das águas pode acarretar estresse oxidativo em peixes, com a formação de espécies reativas que são conhecidas devido aos danos que causam aos tecidos, dentre elas podemos citar o ânion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Oruç & Üner, 2000, Üner et al., 2005). Em resposta à formação dessas espécies reativas, os organismos apresentam uma série de mecanismos de defesa a fim de neutralizá-las, dentre eles estão os sistemas de defesa antioxidante (Monteiro et al., 2006).

Tendo em vista que a contaminação dos ambientes aquáticos é um fato, e que os peixes são alvos indiretos desta contaminação, tornam-se necessárias avaliações toxicológicas de pesticidas utilizados na agricultura nestes organismos, uma vez que muitos são consumidos diretamente após despesca.

2 - OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos do herbicida 2,4-D sobre o crescimento (90 dias) e parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a concentrações subletais em exposição aguda (96 horas) e prolongada (90 dias).

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a exposição prolongada ao herbicida altera parâmetros de crescimento em juvenis de jundiás expostos às concentrações subletais;
- Verificar se a composição básica do muco de peixes expostos ao herbicida 2,4-D por 96 horas ou 90 dias mostra alterações.
- Avaliar os intermediários metabólicos (glicogênio, glicose, lactato e proteína) em diferentes tecidos de *Rhamdia quelen* após exposição aguda e prolongada ao herbicida 2,4-D;
- Analisar a atividade da enzima catalase e a formação de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) em jundiás após as exposições ao herbicida.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

As práticas agrícolas estão diretamente relacionadas com o uso de pesticidas, a fim de controlar as pestes que atacam os produtos cultivados na agricultura, aumentando a produtividade. Entretanto o uso contínuo destes produtos pode ser tóxico, podendo até mesmo ser mutagênico e cancerígeno (Primel et al., 2005). O uso indiscriminado de pesticidas na agricultura é uma grande causa de envenenamento no mundo, pois cerca de três milhões de casos de envenenamento severo são registrados e destes, duzentos e vinte mil culminam com a morte. De acordo com as estatísticas, 99% dos casos registrados ocorrem em países de terceiro mundo, onde os cuidados com a aplicação e dosagem costumam ser menores (Banerjee et al. 1999).

A contaminação dos ambientes aquáticos por estes pesticidas oriundos das práticas agrícolas se tornou um problema de grande importância mundial. Atualmente, existem duas maneiras principais através das quais os pesticidas podem se concentrar no ambiente aquático: uma delas é devido a sua persistência no solo, que ao ser lixiviado libera-os para os cursos de água. A outra forma de contaminação ocorre através de sua evaporação para a atmosfera, chegando até o meio aquático por precipitação (Pan & Dutta, 1998).

Além da possibilidade de contaminação dos cursos de água naturais, temos os sistemas de criação de peixes, prática muito empregada na região Sul da América do Sul. Grande parte dos criadouros localiza-se próximo ou dentro de áreas de plantações agrícolas, mantendo assim, um contato direto dos animais com os produtos químicos utilizados nas lavouras (Soso et al., 2007).

Esses tóxicos causam alterações na composição química dos ambientes aquáticos, o que pode causar sérios prejuízos à fauna natural (Oruç et al., 2004; Adhikari et al., 2004). Assim, a presença contínua de componentes tóxicos nas águas pode causar alterações diversas em peixes, inclusive no comportamento reprodutivo, podendo chegar até mesmo à mortalidade destes indivíduos. Um efeito a longo tempo pode culminar, inclusive, com a extinção de espécies mais susceptíveis a esse tipo de variação ambiental (Soso et al., 2007).

3.2 – HERBICIDA 2,4-D

O herbicida 2,4-D, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, por ser um herbicida de baixo custo e que possui uma boa seletividade, é amplamente utilizado na região Sul do Brasil no controle de algumas plantas daninhas que infestam as plantações agrícolas. Este herbicida possui uma baixa biodegradabilidade, tendo seus resíduos encontrados em boa parte dos cursos de água da região (Primel et al., 2005). A concentração indicada para o uso do herbicida 2,4-D nas plantações da região Sul está entre 0,5 e 1,1 mg L⁻¹ Rodrigues & Almeida (2005). De acordo com Primel et al. (2005) este herbicida possui um baixo potencial de contaminação de águas da superfície e um potencial intermediário na contaminação de águas subterrâneas na região Sul do Brasil. Os herbicidas clorofenoxiacéticos, como o 2,4-D, são utilizados para matar plantas daninhas por suas propriedades químicas que os tornam semelhantes à auxina, o hormônio do crescimento das plantas, realizando uma superestimulação do crescimento que irá culminar com a sua morte (Oruç et al., 2004; Benli et al., 2007). A toxicidade do herbicida 2,4-D em peixes depende da formulação utilizada, sendo que algumas fórmulas são extremamente tóxicas enquanto

outras causam um prejuízo menor aos organismos expostos (Sarıkaya & Selvi, 2005). A formulação comercial do 2,4-D (sal dimetilamina do ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é composta por 72% (720 g L⁻¹) do equivalente em ácido e 86,8% do sal dimetilamina, (BASF, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), registrado sob o número 04118189, Chemical Abstract Service 94-75-7.

3.2.1 – TOXICIDADE DO 2,4-D EM PEIXES

A toxicidade aguda do herbicida 2,4-D é relatada por diversos autores, dentre eles Sarıkaya & Selvi (2005), que obtiveram valores de concentração letal média (CL₅₀) entre 28,23 e 86,90 mg L⁻¹ respectivamente para larvas e adultos de tilápia em 48 horas de experimento. *Astacus leptodactylus* mostrou ser uma espécie muito sensível a este herbicida já que o valor de CL₅₀ -96 horas foi de 32,6 mg L⁻¹ (Benli et al., 2007). O Laboratório de Bioquímica Adaptativa e Toxicológica encontrou um valor para CL₅₀ de jundiás em 96 horas de 745 mg L⁻¹ (dados não publicados). O jundiá pode ser considerado uma espécie mais resistente ao 2,4-D, quando se avalia somente a toxicidade aguda 96h. O herbicida 2,4-D é conhecido por causar alterações no sistema nervoso central, inibindo a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), (Benli et al., 2007). Um estudo realizado em nosso laboratório de pesquisa demonstrou que o herbicida 2,4-D altera alguns parâmetros bioquímicos, como intermediários metabólicos nos tecidos, e inibe a atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro e músculo de piavas *Leporinus obtusidens*. Os peixes foram expostos por 96 horas às concentrações subletais (1,0 ou 10,0 mg L⁻¹) da formulação comercial do herbicida (Fonseca et al., 2007). Neste estudo também se observou que em 96 horas o peixe pode absorver até 30% do composto. Em eritrócitos humanos, um decréscimo na atividade da acetilcolinesterase (in vitro) esteve relacionado ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (Bukowska et al., 2006). Oruç et al. (2004) relataram que a exposição aguda (96 horas) ao herbicida 2,4-D leva a uma situação de estresse oxidativo em carpas (*Cyprinus carpio*), com aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a

catalase. O efeito do 2,4-D em carpas pode ser potencializado quando a exposição ao herbicida é combinada com o inseticida azinphosmethyl (Oruç et al., 2004). Em tilápias (*Oreochromis niloticus*) o 2,4-D e azinphosmethyl e também o efeito individual destes pesticidas se mostrou bastante tóxico, alterando a atividade do sistema antioxidante dos peixes expostos durante 24, 48, 72 e 96 horas (Oruç & Üner, 2000). Outro efeito conhecido do herbicida 2,4-D é a alteração em parâmetros do metabolismo de carboidratos e proteínas em peixes (*Cyprinus carpio*) expostos ao herbicida por 1, 2, 3, 4, 15 e 30 dias às concentrações subletais de 50 e 80 mg L⁻¹. As alterações observadas incluem redução no glicogênio e aumento das proteínas no fígado, e inibição das aminotransferases (GOT) e (GPT) no plasma (Oruç & Üner 1999).

3.3 – JUNDIÁ (*RHAMDIA QUELEN*):

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de teleósteo nativa da região Sul da América do Sul (Barcellos et al., 2003). Esta espécie do gênero *Rhamdia*, pertencente à família Heptapteridae, tem preferência de viver em águas calmas, se escondendo em baixo de troncos e pedras, possui hábitos noturnos. O hábito alimentar é preferencialmente onívoro, porém possuem uma clara tendência à carnívoro (Gomes et al., 2000, Baldisserotto & Radünz Neto, 2004). Esta espécie é considerada rústica, pois tem a capacidade de sobreviver ao intenso frio da região Sul do Brasil durante o inverno, bem como potencializar o seu crescimento durante o verão (Barcellos et al., 2003; Soso et al., 2007). Alevinos de *Rhamdia quelen* também são capazes de sobreviver a diversas alterações na qualidade da água, como temperatura, salinidade, pH, dureza, conforme relatado por Gomes et al. (2000). Devido às características de sobrevivência desta espécie, ela se torna bastante favorável para as práticas de aquicultura que são bem freqüentes na região Sul do Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul (Barcellos et al., 2003; Lazzari et al., 2006). Além disso, esses peixes possuem uma carne de sabor agradável que é bem aceita pelos consumidores (Lazzari et al., 2006). Sendo assim, esta

espécie apresenta grande importância comercial e possui boas características para o cultivo em nossa região.

3.4 – PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

Alterações na qualidade da água podem causar mortalidade e reduzir a produtividade dos peixes. Assim, os testes de toxicidade são baseados na sobrevivência, no crescimento e na reprodução desses organismos não alvo (Soso et al., 2007). Existem poucos estudos que relacionam a toxicidade de pesticidas com o crescimento de organismos aquáticos como os peixes. Alguns xenobióticos que são encontrados no ambiente podem levar as populações expostas a distúrbios no sistema endócrino podendo afetar, assim, o crescimento de muitos organismos (Keen et al., 2005). Um estudo do nosso grupo mostra que piavas (*Leporinus sp*) após exposição prolongada ao herbicida Roundup[®] apresentaram redução nos parâmetros de crescimento e várias alterações metabólicas após 90 dias de exposição (Salbego, 2005).

3.5 – INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS

Produtos tóxicos podem causar alterações biológicas em peixes, as quais podem ser reconhecidas através da medida de alguns componentes do metabolismo (Jyothi & Narayan, 1999). Parâmetros metabólicos são bastante utilizados como indicadores gerais de estresse fisiológico em peixes (Lermen et al., 2004). Dentro desses parâmetros, podemos citar aqueles integrantes do metabolismo de carboidratos, como glicogênio, glicose e lactato, que com frequência se alteram nos tecidos e no sangue dos peixes (Begum & Vijayaraghavan, 1999). Também é bastante utilizada a relação entre carboidratos, proteínas e os caminhos metabólicos destes compostos (Aguilar et al., 2004). As atividades teciduais são muito dependentes do metabolismo de

proteínas por suas funções estruturais, catalíticas e regulatórias (Goto et al., 2004).

Muitos autores descrevem os efeitos tóxicos de pesticidas sobre parâmetros metabólicos em peixes. É conhecido que carpas comuns (*Cyprinus carpio*) expostas ao herbicida 2,4-D (50 ou 80 mg L⁻¹) sofrem alterações em alguns parâmetros do metabolismo de carboidratos, como a redução do glicogênio hepático e de proteínas em diferentes tecidos, como o aumento das proteínas hepáticas, e a redução das aminotransferases neste tecido (Oruç & Üner, 1999). Jundiás expostos a concentrações subletais do herbicida clomazone apresentaram aumento nos níveis de glicogênio e proteína hepáticos, uma redução significativa do glicogênio do músculo, bem como um aumento na glicose plasmática, além de outras alterações nos diferentes tecidos (Crestani et al., 2006). Parâmetros metabólicos apresentaram mudanças em relação ao grupo controle em piavas (*Leporinus obtusidens*) expostas ao herbicida glifosato por 96 horas, tais como o aumento nos valores de glicose e glicogênio do fígado, com uma significativa redução destes no músculo branco e também ocorreu redução nos níveis de lactato e proteína hepática (Gluszczak et al., 2006). Fonseca et al. (2007) demonstraram que *Leporinus obtusidens* expostos ao herbicida 2,4-D por 96 horas às concentrações de 1,0 ou 10 mg L⁻¹ apresentaram modificações no padrão de alguns parâmetros metabólicos, como redução do glicogênio e lactato do músculo branco, além do aumento dos níveis de proteína. No fígado observou-se uma redução nos valores de lactato e proteína, sem alterações nos níveis de glicose e glicogênio. No plasma foi encontrada redução nos valores de glicose, bem como aumento nos níveis de proteína e lactato. O possível estresse causado pela intoxicação com 2,4-D pode levar a estes efeitos tóxicos citados.

3.6 – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Organismos intoxicados por poluentes ambientais, ao metabolizá-los, produzem constantemente espécies reativas de oxigênio (EROS) (Üner et al.,

2005). Dentre elas temos o ânion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Oruç & Üner, 2000). Essas moléculas, por sua vez, são altamente reativas, podendo causar diversos danos aos tecidos produzindo peroxidação lipídica, danos ao DNA e oxidação de proteínas, levando o organismo a uma situação de estresse oxidativo (Livingstone, 2001; Monteiro et al., 2006). Em resposta ao perigo que representa a formação dessas espécies reativas o organismo apresenta uma variedade de mecanismos de defesa na tentativa de neutralizar o efeito causado por elas, que consiste no sistema de defesa antioxidante (Monteiro et al., 2006). A formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pode ser diagnosticada como um biomarcador da peroxidação lipídica em peixes (Almroth et al., 2005). O malonildialdeído (MDA) é um produto bem característico da oxidação de ácidos graxos polinsaturados nas lipoproteínas. Esses ácidos graxos são bastante sensíveis aos radicais hidroxilas (Almroth et al., 2005).

A enzima catalase participa do mecanismo de defesa antioxidante e pode ser utilizada como indicador de estresse oxidativo em peixes (Lionetto et al., 2003, Ahmad et al., 2006; Monteiro et al., 2006). Esta enzima é uma importante integrante do sistema de defesa antioxidante, e está localizada principalmente nos peroxissomos. Ela é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) originado do metabolismo de longas cadeias de ácidos graxos nos peroxissomos (Üner et al., 2005). Vários autores relatam alterações nos sistemas de defesa antioxidante em peixes na presença de pesticidas. Jundiás expostos às concentrações subletais de 0,5 ou 1,0 mg L⁻¹ do herbicida clomazone mostram redução na atividade da catalase e um aumento nos níveis de TBARS do fígado (Crestani et al., 2007). Jundiás expostos a concentrações subletais de glifosato não apresentaram alteração na atividade da enzima catalase, porém ocorreu aumento no TBARS, evidenciando peroxidação lipídica no tecido muscular (Gluszczak et al. 2007a). Piavas expostas por 96 horas ao herbicida glifosato apresentaram aumento na atividade da catalase hepática de maneira dose-dependente, também apresentando aumento nos níveis de TBARS neste tecido (Gluszczak et al., 2007b). Tilápias (*Oreochromis niloticus*) e carpas comuns expostas ao herbicida 2,4-D e ao inseticida

azinphosmethyl não apresentaram alterações nos níveis de MDA e na atividade da enzima catalase após exposição subletal (Oruç & Üner, 2000).

4. RESULTADOS:

4.1. MANUSCRITO 1:

LONG TERM OF SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) EXPOSURE TO COMMERCIAL FORMULATION: GROWTH AND SOME METABOLIC AND ENZYMATIC PARAMETERS

Milene Braga da Fonseca, Alexandra Pretto, Charlene Cavalheiro de Menezes, Bibiana Silveira Moraes, Bárbara Clasen, Vania Lucia Loro*

Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding Author:

(*) Dr Vania Lucia Loro

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil

Phone: + 55 3220-9456

Fax: + 55 3220-8240

e-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

This study aimed to analyze 2,4-D effect on silver catfish (*Rhamdia quelen*) after 90 days exposure to commercial formulation of 2,4-D herbicide at 0 (control), 0.5 or 2.0mgL⁻¹. Growth and metabolic parameters as lactate, glycogen, glucose and protein in liver, white muscle and kidney tissues were determined. Catalase activity and TBARS in these tissues were studied. Chronic exposure to 2,4-D herbicide affected the growth and some metabolic and enzymatic parameters. Fish exposed to 2,4-D showed decrease in tissues glycogen at both concentrations tested. Glucose showed increased liver levels and decreased in muscle and kidney at both herbicide concentrations. This parameter was not altered in the plasma. Lactate increased in all tissues as compared to the control, but decrease in the plasm. In contrast, protein levels reduced in the liver, white muscle, kidney and plasma at both 2,4-D concentrations. 2,4-D induced liver catalase in *R. quelen*. Fish exposed to 2,4-D showed increased TBARS levels in muscle tissue and reduced liver TBARS at both concentrations tested. Brain TBARS was not altered after 2,4-D exposure. Soluble sugar was reduced at both 2,4-D concentrations and an increase in protein levels at the highest concentration tested was observed in mucous layer. The present study showed that after long term exposure to 2,4-D reduced growth and alter metabolic parameters. The parameters measured can be used as herbicide toxicity indicators considering environmental relevant concentration.

KeyWords: 2,4-D, growth, metabolic parameters, silver catfish, catalase, TBARS.

1. Introduction

Human activities, such as agriculture, can affect aquatic organisms like fish, due to residual pesticides that can reach in the environment. Fish showed changes in metabolic and enzymatic parameters as a consequence of pesticide induced toxicity (Fatima et al., 2007). The fish responses to environment contamination are initially reversible, but at longer exposure can be permanent. The alterations frequently occur at cellular and biochemical levels, leading to changes in the structure and function of the cells, tissues, physiology and behavior of the organism, as survival skills, inhibited growth and reproductive function (Oruç and Uner, 1999; Parvez and Raisuddin, 2005). Pesticides are environmental contaminants introduced to ensure field in modern agriculture (Senger et al., 2005). 2,4-D or 2,4 dichlorophenoxyacetic acid is a systemic herbicide widely used in the world for broadleaf weeds control. This herbicide showed physiological properties similar to auxin (natural plant hormone) resulting in overstimulation of plant growth and culminating with death (Oruç and Uner, 2004; Ateeq et al., 2005; Benli et al., 2007). The recommended 2,4-D concentration for use in agriculture of Southern Brazil ranges from 0.5 to 1.1mgL⁻¹, calculated according to Rodrigues and Almeida (2005). 2,4-D can be considered as having low contamination potential for surface waters and as a transitional contaminant of groundwater in Southern Brazil. This herbicide has low biodegradability and has been frequently detected in watercourses of this region (Primel et al., 2005).

Teleost fish may be good indicators of contamination by pollutants such as pesticides because their biochemical responses are similar to those found in mammals, and also due to high exposure (Sancho et al., 2000; Begum, 2004). Many xenobiotics induces oxidative stress in fish, resulting from the production of reactive species. These substances are highly reactive, causing damage to lipid, proteins, carbohydrates and nucleic acids (Sevgiler et al., 2004; Üner et al., 2005). Cells present the antioxidant defense system to neutralize the effects of free radicals, such as superoxide anion radical (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical (HO) (Monteiro et al., 2006, Sevgiler et al., 2007). The measurement of the enzymes and metabolic parameters in fish tissues are important to verify fish

response to the stress caused by xenobiotics present in the environment (Jyoti and Narayan, 1999).

Mucous composition can also be altered due to pesticide exposure (Tromeur et al., 1992). A mucous layer that is to act as mechanical protection and hydrodynamic lubricant covers fish. Mucous secretion also acts as an active anti-parasitic and anti-bacterial agent (Tromeur et al., 1992; Sabóia-Moraes et al., 1996). Fish skin mucous is composed by epithelial mucins which are widely distributed in animal tissues. Basic mucous composition is macromolecular glycoproteins, containing sulphate residues.

The silver catfish (*Rhamdia quelen*) is an endemic species of South America and widely spread in natural and artificial aquatic environments of this region. This species is relatively resistant to cold environment and grown in summer making it ideal for any region with subtropical climate (Barcellos et al., 2003; Soso et al., 2007). Thus, the aim of this study was to investigate the effects of a chronic exposure of commercial formulation of 2,4-D herbicide on growth, metabolic parameters and some antioxidants defenses of silver catfish as possible indicators of toxicity.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

The herbicide used in this experiment was the commercial formulation 2,4-D (2,4-D acid equivalent 720g L^{-1} and dichlorophenoxyacetic dimethylamin salt of 2,4-D 868 g L^{-1}), Chemical Abstract Service (CAS 94-75-7), register number 04118189, BASF S.A., São Bernardo do Campo, SP, Brazil. 2,4-D has soil and water half-life around 7 and 7,5 days respectively. The water solubility for this herbicide is 311mgL^{-1} (Primel et al., 2005). All chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2 Fish

Juvenile silver catfish of both sexes (9.0 g and 10.0 cm), supplied by the Universidade Federal de Santa Maria's fish farm were used in the experiments. The fish were acclimated for 10 days to laboratory conditions, in 250L tanks, with aerated water. Water conditions were: temperature $24 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, pH 7.0 ± 0.2 units, dissolved oxygen $6.8 \pm 0.3\text{mg L}^{-1}$, non-ionized ammonia $0.005 \pm 0.002\text{mg L}^{-1}$, nitrite $0.05 \pm 0.02\text{mg L}^{-1}$, alkalinity $65 \pm 4.9\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ and hardness $19 \pm 1.3\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$. All water parameters were determined according to Boyd and Tucker (1992). During acclimation and experimental period (90 days), fish were fed twice a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). Feces and pellet residues were removed daily by vacuum.

2.3 Experimental design

The LC_{50} (medium lethal concentration) obtained for *Rhamdia quelen* was 745mgL^{-1} (unpublished data). Experimental 2,4-D concentrations were chosen according to Rodrigues and Almeida (2005), considering the minimum herbicide concentration indicated for use in agriculture in Southern Brazil (0.5mgL^{-1}), and the high environmental relevant concentration for cultivation use (2.0mg L^{-1}). After acclimation, groups of fish ($n=8$) were redistributed in continuously aerated 250L boxes and exposed for 90 days to: 0 (control), 0.5 or 2.0mg L^{-1} of 2,4-D (72g a e L^{-1}). All tests were carried out in triplicate and fish were fed to satiation twice a day. Stock solutions were prepared by dissolving 2,4-D in water and added to the experimental tanks. The water in the boxes was renewed every to 48h to remove the residues and replace herbicide. The experimental period (90 days) was chosen considering previous studies in our laboratory using long-term fish exposure to herbicide.

2.4 Growth and metabolic parameters

At the end of the exposure period, all fish were sampled, weighed and measured for growth parameters estimation (final weight, final length, G (specific growth rate), daily mass gain (DMG)). The mucus was carefully

scraped from dorsal body surface (total area 6cm²) using a cotton swab. After scraping, the cotton was immersed in 2ml of distilled water, and the sample was used to determine soluble sugar (Dubois et al., 1956) and protein (Lowry et al., 1951). The fish blood was quickly collected for determining plasma parameters. Punching the spinal cord behind the opercula killed the fish. Brain, liver, kidney, and white muscle were removed and placed on ice, frozen in liquid nitrogen and then stored at -20°C. Liver, kidney and muscle glycogen were determined according to Bidinotto et al. (1997). Tissue protein was estimated according to Lowry et al. (1951). Tissue samples were homogenized with 10% trichloroacetic acid using a motor-driven teflon pestle and centrifuged at 1000 x G for 10min. Deproteinated supernatant was used for the determination of lactate (Harrower and Brown, 1972) and soluble sugar (Park and Johnson, 1949).

2.5 Catalase activity assay

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesov, 1972). Samples of liver were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (with 0.1% Triton X100 and 150mM NaCl) (1:20 dilution), centrifuged at 10 000 x G for 10min at 4°C. Briefly, the assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50mM, pH 7.0), 0.05mL H₂O₂ (0.3M) and 0.05mL homogenate. Change of H₂O₂ absorbance in 60 seconds was measured at 240nm. The enzyme activity was expressed as micromoles of H₂O₂ reduced per milligram of protein per minute ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{protein min}^{-1}$).

2.6 TBARS determination

Peroxides produced from oxidative stress can be quantified by a TBARS assay. This is performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which is optically measured. Brain, white muscle and liver samples were prepared as reported for the catalase assay. Homogenates (100-400 μL) were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 molar

acetic acid (pH 3.4), 0.8% thiobarbituric acid was added to adjust to a final volume of 2.0mL. The reaction mixture was placed in a microcentrifuge tube and incubated for 90min at 95 C. After cooling, it was centrifuged at 5.000 x G for 10min and the optical density at 532nm was determined. TBARS levels are expressed as nmols MDA per mg of protein according to Ohkawa et al. (1979). Protein levels were estimated spectrophotometrically by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

2.7 Statistical procedures

One-way analysis of variance (ANOVA) following by Tukey test. Data (n=24) were expressed as mean \pm standard deviation (SD) and mean differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

Silver catfish exposed to 2,4-D for 90 days at 0.5 or 2.0mgL⁻¹ showed reduction on daily mass gain (55 and 58%, respectively) when compared to control. Specific growth rate was reduced 40 and 50%, respectively. The condition factor decreased 22 and 12% compared to the control (Table 1). The protein of the mucous layer increased at high concentration tested and soluble sugar reduced at both 2,4-D concentrations tested (Figure 2). In this study, silver catfish exposed to 2,4-D showed liver glycogen and protein reduction, but glucose and lactate increased in liver at both concentrations when compared to control (Table 2). White muscle showed glycogen and glucose reduction levels at both herbicide concentrations tested, however protein reduction was observed only at the high concentration tested. White muscle lactate increased at both 2,4-D concentrations as compared to the control (Table 2). The kidney presented a significant reduction in glycogen and glucose levels at both concentrations, but increased lactate levels as compared to control. In this tissue, the protein content was not significantly altered after 2,4-D exposure. The plasma metabolic parameters changes were the following: reduction of protein and lactate levels for both concentrations tested and glucose levels was not altered as compared to control (Table 1). The catalase activity was increased at

both concentrations tested as compared to the control (Figure 1). TBARS levels were not altered in brain tissue of fish exposed to 2,4-D. In contrast, muscle tissue showed an increase of 63 and 84%, respectively, in TBARS levels when compared to the control values. Liver TBARS levels decreased significantly ranging from 18% (0.5mgL^{-1}) and 30% (2.0mgL^{-1}) in comparison to the control group (Figure 3).

4. Discussion

Exposure to 2,4-D for 90 days reduced fish growth, probably due to the commercial formulation of 2,4-D effect. Considering that 2,4-D is a potent water contaminant, and *R. quelen* can absorb up to 30% within 96 h (Fonseca et al., 2007), is probably that a long term exposure to this herbicide affects growth by altering fish metabolism. Another important parameter evaluated in this study was mucous layer composition, which after 2,4-D exposure presented a decrease of soluble sugar and increase in protein. The mucous layer is important to protect and reduce water impact in fish, but water herbicide contained seems to influence mucous layer composition as in this study. Similarly *Leporinus obtusidens* exposed to glyphosate based herbicide increase protein of the mucous layer (Gluszczak et al., 2007b).

The measurement of lipid peroxidation through the quantification of TBARS has been used as an indicator of oxidative stress in fish. Herbicides or their metabolites can change oxidative state, enhanced the intracellular formation of lipid peroxides resulting in oxidative stress. However, in this study *Rhamdia quelen* exposed to 2,4-D showed an increase of TBARS levels only in the muscle tissue, that is a compatible response to lipid peroxidation. Liver TBARS decrease levels at both herbicide concentrations and no alteration was observed in brain tissue. TBARS formation can change according to the tissue considered. Liver catalase induction was observed at both 2,4-D concentrations tested, and this response could be related to TBARS response observed in *R. quelen* tissues. The sum of results of TBARS levels and catalase may indicate a compensatory response of fish in order to survive after muscle lipid damage caused the herbicide. On contrast of TBARS results of this study, the same fish

Rhamdia quelen exposed to clomazone (0.5 or 1.0 mg L⁻¹) showed an increase in TBARS levels, particularly in the liver, after 12, 24, 48, 96 or 192 h of exposure (Crestani et al., 2007). *R. quelen* exposed to clomazone herbicide (12, 24 or 96h) showed different catalase response where enzyme activity reduction was observed in the liver of silver catfish exposed to clomazone (0.5 or 1.0 mg/L) (Crestani et al., 2007). Tissue differences concerning TBARS formation are frequently attributed to the variation in antioxidant mechanisms of fish species and also in the tissue considered (Ahmad et al., 2000; Moraes et al., 2007).

Table 1. Growth parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after exposure (90 days) to 2,4-D at 0.0 (Control), 0.5 or 2.0 mgL⁻¹.

Parameters	Control	0.5 mg L ⁻¹	2.0 mg L ⁻¹
Final weight (g)	27.8	17.5*	15.2*
Total body length (cm)	15.2	14.2	13.0*
Daily weight gain (g)	0.2	0.1*	0.1*
Specific growth rate (% day ⁻¹)	1.2	0.7*	0.6*
Condition factor	0.8	0.6*	0.7*

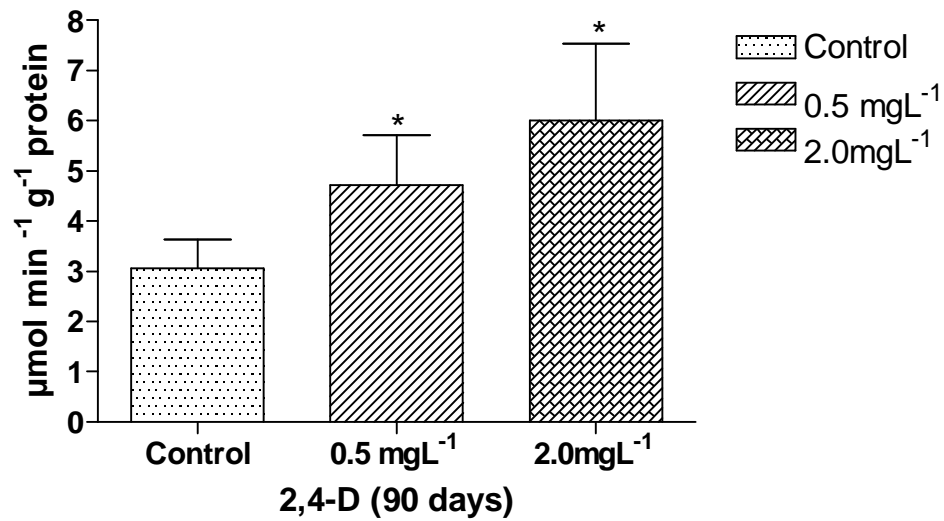
* Indicates difference between treatments and the control by Tukey test at $P \leq 0.05$.

Table 2. Hepatic, white muscle, kidney and plasma metabolites of *Rhamdia quelen* exposed to different concentrations of 2,4-D for 90 days. Data represent the mean \pm SD, (n=24).

Tissue	2,4-D (mgL ⁻¹)	Metabolic Parameter			
		Glycogen (glycosyl-glucose g ⁻¹)	Glucose (μ mol g ⁻¹)	Lactate (μ mol g ⁻¹)	Protein (mg g ⁻¹)
Liver	Control	94.0 \pm 9.9	29.7 \pm 2.3	4.2 \pm 0.4	171.0 \pm 12.3
	0.5	72.0 \pm 10.7*	35.0 \pm 1.8*	4.7 \pm 0.4*	152.0 \pm 4.5*
	2.0	70.0 \pm 5.3*	38.6 \pm 1.7*	5.0 \pm 0.2*	159.0 \pm 2.3*
Muscle	Control	2.1 \pm 0.2	4.4 \pm 0.1	8.6 \pm 0.4	151.0 \pm 12.0
	0.5	2.1 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1*	16.5 \pm 2.2*	121.0 \pm 12.0
	2.0	1.7 \pm 0.2*	3.4 \pm 0.6*	16.9 \pm 1.8*	84.0 \pm 8.2*
Kidney	Control	87.0 \pm 10	17.4 \pm 1.5	4.34 \pm 0.5	113.0 \pm 7.8
	0.5	40.0 \pm 5.3*	15.7 \pm 1.3*	6.08 \pm 1.1*	111.0 \pm 6.0
	2.0	36.0 \pm 4.6*	12.5 \pm 1.7*	6.09 \pm 0.5*	120.0 \pm 6.0
Plasm	Control	37.5 \pm 1.9	1.7 \pm 0.2		48.1 \pm 4.0
	0.5	39.5 \pm 4.1	1.3 \pm 0.1*		28.4 \pm 3.6*
	2.0	37.2 \pm 4.0	1.2 \pm 0.1*		28.5 \pm 3.9*

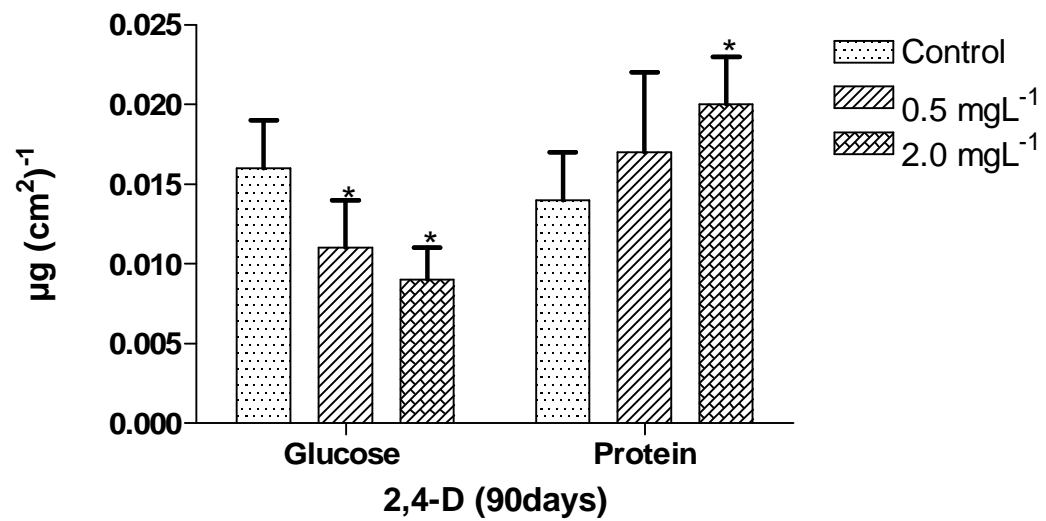
* Indicates difference between treatments and the control by Tukey test at $P \leq 0.05$.

Fig. 1. Catalase activity in the liver of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed 90 days to two concentrations a commercial formulation of 2,4-D. Values are means \pm SD (n=24). Data are expressed as $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$



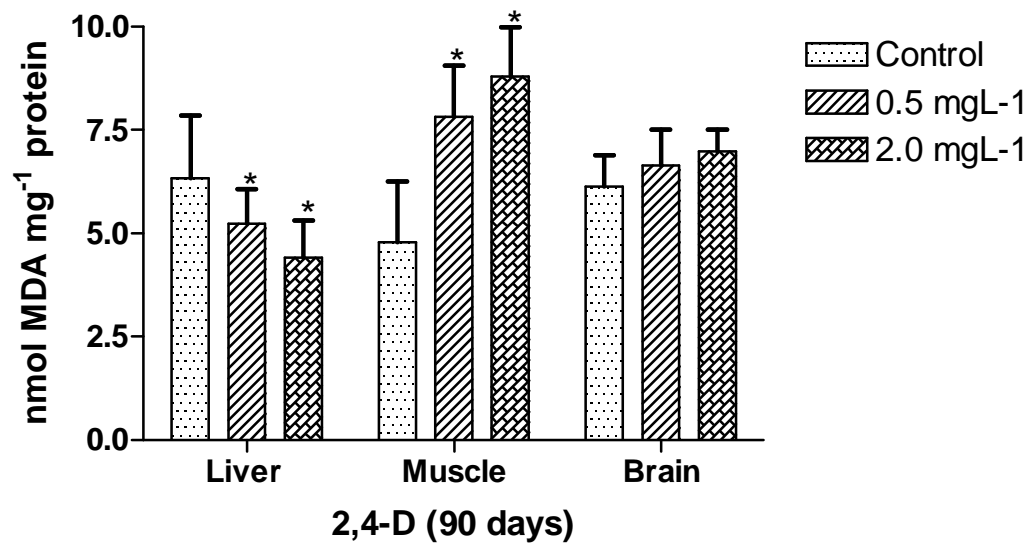
* Indicates difference between treatments and the control by Tukey test at $P \leq 0.05$.

Fig. 2. Protein and glucose levels of the mucus layer of *Rhamdia quelen* after chronic exposure (90 days) to 2,4-D. Data represent the mean \pm SD, (n=24).



* Indicates difference between treatments and the control by Tukey test at $P \leq 0.05$.

Fig. 3. TBARS levels in brain, liver and white muscle of *Rhamdia quelen* exposed to 0.5 and 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D for 90 days. Data represent the mean \pm SD, (n=24).



* Indicates difference between treatments and the control by Tukey test at $P \leq 0.05$.

5. References:

- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosph.* 65, 952-962.
- Ateeq, B., Farah, M. A., Ahmad, W., 2005. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorofenoxyacetic-acid-and butachlor- exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 348-354.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Lacerda, L.A., Terra, S., 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) and hormonal and biochemical changes after acute stress. *Aquac. Res.* 34, 1465-1469.
- Begum, G., 2004. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. *Aquat. Toxicol.* 66, 83-92.
- Benli, A. Ç. K., Sarikaya, R., Sepici-Dincel, A., Selvi, M., Sahin, D., Erkoç, F., 2007. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 296-299.
- Bidinotto, P.M.; Souza, R.H.S.; Moraes, G., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol Tec CEPTA Pirassununga* 10, 53-60.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, USA, p.183.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Colby, S. R., Lym, R. G., Hill, E. R., Mc Avoy, W. J., Kitchen, L. M., Prasad, R., 1989. *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*. 6th ed. Illinois.

- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, dos S. D., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, Loro, V.L., 2007. Effects of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver satfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosph.* 67, 2305-2311.
- Duboie, M.G., Gilles, K.A, Hamilton, J.K., Roberts, P.A, Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-358.
- Fatima, M., Mandiki, S.N.M., Douxfils, J., Silvestre, S., Coppe, P., Kestemont, P., 2007. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish Immune and antioxidants effects. *Aquat. Toxicol.* 81, 159-167.
- Fonseca, M.B., Gluszczak, L., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Gonçalves, F.F., Loro, V.L., 2007. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.08.006.
- Gluszczak, L., Loro, V.L., Moraes, B.S., Raabe, A., Pretto, A., Fonseca, M.B., Menezes, C.C., 2007b. Acute exposure of Roundup® affects oxidative parameters in piavas (*Leporinus obtusidens*). In press.
- Harrower, J.R., Brown, C.H., 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.* 32, 709-711.
- Jyothi, B. and Narayan, G. 1999. Certain pesticide- induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.) *Food and Chem. Toxicol.* 37, 417-421.
- Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Far, A.L., Randal, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 141-149.
- Moraes, B.S., Loro, V.L., Glusckzac L., Pretto, A., Menezes, C.C., Marchezan, E., Machado, S.O., 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic

and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). Chemosph. 68, 1597-1601.

Nelson, D.P. & Kiesov, L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). Anal. Biochem., v. 49, p. 474-478, 1972.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., v. 95, p. 351-358, 1979.

Oruç, E.Ö., Üner, N., 1999. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. Environ. Pollut. 105, 267-272.

Oruç, E., Sevgiler, Y., Üner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. Comp. Biochem. Physiol. Part 137, 43-51.

Park, J.T., Johnson, M.J., 1949. A submicro determination of glucose. J. Biol. Chem. 181,149-151.

Parvez, S. & Raisuddin, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Environ. Toxicol. and Pharm., v.20, p. 112-117, 2005.

Primel, E.G; Zanella, R. ; Kurz, M H S ; Gonçalves F F ; Machado, S L de O ; Marchezan, E., 2005. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. Química Nova. 28, 4, 605-609.

Rodrigues, B.N. & Almeida, F.S., 2005. Guia de Herbicidas. 5ª ed. Londrina 592 pp.

Sabóia-Moraes, S.M.T., Hernandez-Blazquez, F.J., Mota, D.L., Bittencourt, A.M., 1996. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. J. Fish Biol. 49, 545-548.

Sancho, E., Fernández-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., 2000. Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla*

as response to herbicide-contaminated water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 46, p. 57-63.

Senger, M. R., Rico, E. P., Arizi, M. B., Rosemberg, D. B., Dias, R. D., Bogo, M. R., Bonan, C. D., 2005. Carbofuran and Malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicol.*, v. 212, 107-115.

Sevgiler, Y., Oruç, E.O., Üner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pest. Biochem. Physiol.* 78, 1-8.

Sevgiler, Y., Piner, P., Durmaz, H., Üner, N., 2007. Effects of N-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio*. *Pest. Biochem. Physiol.* 87, 248-254.

Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and effects reproduction of female jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Pharm.* 23, 308-313.

Tromeur, F., Guerard, F., Gal, Y.L., 1992. Mucous glycoprotein from the ray *Raja batis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102b, 773-778.

Üner, N., Oruç, E.O.; Sevgiler, E.; Sahin, N.; Durmaz, H.; Usta, D.; 2005. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharm.* 21, 242-245.

3.2. MANUSCRITO 2:

A COMMERCIAL FORMULATION OF 2,4-D AFFECTS TOXICOLOGICAL AND METABOLIC PARAMETERS OF THE TELEOST *Rhamdia quelen*

Milene Braga da Fonseca, *Vania Lucia Loro, Bárbara Clasen, Alexandra Pretto, Alice Raabe and Bernardo Baldisserotto

Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding Author:

(*) Dr. Vânia Lucia Loro.

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: + 55 –220-9456

Fax: + 55 (55) 220-8240

E-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

The effects of 2,4-D (0.5 or 2.0 mgL⁻¹) on TBARS formation, catalase activity and metabolic parameters were evaluated in silver catfish (*Rhamdia quelen*) tissues after 96 h exposure. Catalase activity was increased in the liver at both concentrations tested. TBARS increased in liver tissue, but there was no significant change in white muscle and brain tissues. White muscle glycogen was reduced for both 2,4-D concentrations. Liver tissue showed glycogen increase and no significant change was observed in kidney at both 2,4-D concentrations tested. Liver protein was reduced after exposure at 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ of 2,4-D, but no significant changes were observed in white muscle and kidney tissues for this parameter. Lactate levels showed reduction in white muscle, liver and kidney tissues after 2,4-D exposure. 2,4-D also produced a decrease in blood lactate at both concentrations tested, but no changes were observed in plasma protein and glucose levels. In conclusion, the results obtained indicate that 2,4-D produces liver oxidative stress, affecting catalase activity and TBARS formation. Some tissue metabolic parameters of silver catfish were also altered indicating metabolic disorders. The stress generated by 2,4-D exposure is the probable cause of alterations observed. Measured parameters can be use as 2,4-D fish toxicity indicators.

Keywords: 2,4-Diamin, herbicide, Catalase, TBARS, glycogen, glucose, protein, fish.

1. Introduction

Environmental contamination by pesticides may cause physiologic and behavioral changes in fish and also affect functions such as reproduction and metabolism (Oruç and Uner 1999; Bretaud et al., 2000). 2,4-D is a widely used herbicide in the world and also in Southern Brazil due to its low cost and good selectivity. This herbicide has been frequently detected in water courses (Primel et al., 2005, Chingombe et al., 2006). The 2,4-D concentration recommended for use in agriculture of Southern Brazil ranges from 0.5 to 1.1 mg L⁻¹ calculated according to Rodrigues and Almeida (2005). 2,4-D can be considered as having low contamination potential for surface waters and as a transitional contaminant of groundwater in Southern Brazil (Primel et al., 2005). According to Oruç et al. (2004), 2,4-D showed properties similar to auxin, a natural plant hormone, which promotes overstimulation of growth and death. This herbicide is considered to be non-toxic for fish at low doses for some authors (Gallagher and Di Giulio, 1991) however, other studies demonstrate that fish tissues can absorb up to 30% of waterborn 2,4-D (Fonseca et al., 2007). Generally, biochemical parameters are very sensitive to sublethal concentration of many stressful agents (Sancho et al., 1997). Organisms exhibit a characteristic response to a stressor that may be measured through a variety of enzyme activities and metabolic parameters in blood, liver and muscle. These responses frequently include depletion of glycogen stores from fish tissues like liver and muscle (Begum & Vijayaraghavan, 1999). For evaluate a possible 2,4-D toxicity we chose general parameters (glucose, glycogen, lactate, protein), basic mucous layer composition and stress oxidative parameters.

Environmental pollutants such a pesticides frequently induce formation of reactive species (Sevgiler et al., 2004). These reactive species may impaired oxidative metabolism and cause damage to lipids, proteins, carbohydrates or nucleic acids (Parvez and Raisuddin, 2005). Pesticides induced lipid peroxidation (LPO) has been observed in fish tissues. Variations in the response of antioxidant system have been proposed as indicators of pollutant mediated oxidative stress (Oruç et al., 2004; Crestani et al., 2006). The effect of 2,4- D has been little studied in fish species of Southern Brazil.

Silver catfish (*Rhamdia quelen*) is a native freshwater fish from Southern Brazil and shows good potential for cultivation and commercial market (Barcellos et al., 2003). Some studies demonstrated that exposure to different herbicides changed metabolic parameters in jundiás (Crestani et al., 2006; Gluszczak et al., 2007a). The objective of this study was to verify if 2,4-D concentrations used in agriculture affect catalase activity, TBARS formation and metabolic parameters of silver catfish.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design and metabolic determinations

Silver catfish of both sexes were obtained from the Santa Maria Federal University (UFSM) fish farm (RS- Brazil). Fish (weight, 15 ± 0.5 g; length, 6 ± 1.0 cm) were acclimated to laboratory conditions for 10 days. They were kept in continuously aerated tanks (250L) with a static system. Water quality characteristics were tested at the beginning, middle and end of exposure. Mean values of water parameters were: temperature $21 \pm 2^\circ$ C, pH 7.4 ± 0.2 and dissolved oxygen 7.8 ± 0.2 mg L⁻¹. Fish were fed twice a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). Feces and pellet residues were removed daily by vacuum. The commercial 2,4-D (2,4-D acid equivalent 720 g L⁻¹ and diclorofenoxiacético dimetilamina salt of 2,4-D 868 g L⁻¹), Chemical Abstract Service (CAS 94-75-7), register number 04118189, BASF S.A., São Bernardo do Campo, SP, Brazil was used in experimentation. The 2,4-D concentrations used in the experiments were chosen considering the recommended concentration used in agriculture in Southern Brazil, ranging from 0.5 to 1.1 mg L⁻¹ (Rodrigues and Almeida, 2005). Following acclimation period (10 days), the fish were transferred to glass tanks (50 L) with controlled aeration and temperature. Groups of 8 fish per tank were exposed for 96 hours to: 0 (control), 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ of 2,4-D. All tests were carried out in triplicate. The 2,4-D was monitored in water of experimental tanks every day following the method proposed by Primel et al., (2005) (Data not shown). At the end of the exposure period (96 h), all fish were sampled and the mucus was carefully scraped from dorsal body surface (total area 6 cm²) using a cotton swab. After scraping, the cotton was immersed in 2 mL of distilled water, and the sample

was used to determine soluble sugar (Dubois et al., 1956) and protein (Lowry et al., 1951). After this, blood was collected from the caudal vein with a 1 ml heparinized syringe, centrifuged (10 min, 3000 x G, 4° C) and used for metabolite determination. Plasma total protein was estimated in accordance with Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard. Plasma glucose was measured by the glucose oxidase (LABTEST test kit). Plasma was dissolved in 10% trichloroacetic acid (1:20 dilution) and lactate was estimated in accordance with Harrower and Brown (1972). Tissues (brain, liver and white muscle) were removed and placed on ice, frozen in liquid nitrogen and then stored at -20° C. Liver and white muscle glycogen was determined in accordance with Bidinotto et al. (1997). Tissue protein was estimated in accordance with Lowry et al. (1951). Tissue samples were homogenized with 10 % trichloroacetic acid (TCA) using a motor-driven teflon pestle and centrifuged at 1000 x G for 10 min. Supernatant (protein free) was used for the determination of lactate (Harrower and Brown, 1972) and soluble sugar (Park and Johnson, 1949).

2.2. Catalase activity

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesov, 1972). Samples of liver were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (with 0.1% Triton X100 and 150 mM NaCl) (1:20 dilution), centrifuged at 10 000 x G for 10 min at 4°C. Briefly, the assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50mM, pH 7.0), 0.05 mL H₂O₂ (0.3 M) and 0.05 mL homogenate. Change of H₂O₂ absorbance in 60 s was measured at 240 nm. The enzyme activity was expressed as micromoles of H₂O₂ reduced per milligram of protein per minute ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$).

2.3. TBARS determination

Tissues samples (brain, muscle and liver) were prepared as reported for the catalase assay. Brain, white muscle and liver homogenates (100-400 μ L) were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 molar acetic acid (pH 3.4), 0.8% thiobarbituric acid was added to adjust to a final volume of 2.0 mL. The reaction mixture was placed in a microcentrifuge tube and incubated for 90 min at 95°C. After cooling, it was centrifuged at 5.000 x G for 10 min and the optical density at 532 nm was determined. TBARS levels are expressed as nmols MDA per mg of protein according to Ohkawa et al. (1979). Protein levels were spectrophotometrically estimated by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

2.4. Statistical analysis

Toxicology and metabolic parameters were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by tukey test. Results obtained (n=24) were expressed as mean \pm standard deviation (SD) and mean differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

3. Results and Discussion

The study showed that 2,4-D increased significantly catalase activity and TBARS levels in the liver of silver catfish ($P \leq 0.05$) at both concentrations tested (Figure 1). Liver seems to be affected by 2,4-D forming reactive species as TBARS, and antioxidant defense represented by catalase is activated in this case. On the contrary, no alteration was observed in the brain and the white muscle concerning TBARS formation (Figure 2). Elevated TBARS levels on different tissues induced by aquatic contaminants such as pesticides have been observed by some authors (Li et al., 2003; Üner et al., 2005). The results of this study are in agreement with Crestani et al. (2007), who demonstrated an increase of liver TBARS formation in *Rhamdia quelen* after clomazone (12-192 h) exposure. However, in some species TBARS levels in the liver were not altered and white muscle increase 56% compared to control after 96 h exposure to a glyphosate-based herbicide (Gluszczak et al., 2007a).

Different classes of environmental pollutants or their metabolites can change the metabolic state of the liver because of its importance for the detoxification process. In this study after exposure to 2,4-D silver catfish exhibited a significant decrease of protein and lactate levels in the liver, as compared to control values. However, liver glycogen showed increased and glucose remained unaltered. The white muscle tissue showed a significant decrease of glycogen and lactate at both 2,4-D concentrations tested, but protein and glucose were not altered. After exposure to 2,4-D silver catfish showed lower kidney lactate level, but no significant alteration was detected in glucose, glycogen and protein levels (Table 1). The protein reduction observed in the liver of silver catfish exposed to 2,4-D may indicate a response to stress generated by herbicide. A similar response of protein reduction was obtained by Fernández-Vega et al. (2002) in eels exposed to thiobencarb and by Oruç and Üner (1999) in *Cyprinus carpio* exposed to 2,4-D.

The decrease observed in white muscle glycogen and lactate in this study may indicate that stress caused by the herbicide is accompanied by a higher dependence on the oxidative degradation of glycogen. In contrast with this work, Oruç and Üner et al. (1999) observed liver protein increase after exposure to 2,4-D for 30 days. Gill et al. (1991) found an increase in liver protein following endosulfan intoxication. The decrease of liver and white muscle lactate may indicate higher gluconeogenesis adaptation. In summary, these results suggest that after 2,4-D exposure gluconeogenesis was preferred and could be a response against energy depletion favoring carbohydrate oxidation. Glycogen reductions in white muscle after pesticide exposure have been reported in several studies. Fish frequently use glycogen store when in hypoxia situation generated by pesticide exposure (Sancho et al., 1998; Oruç and Üner, 1999; Aguiar et al., 2004). Muscular glycogen decreased in *Clarias batrachus* exposed to organophosphate rogor, (Begum and Vijayaraghavan, 1999), but no changes were observed in liver glycogen of *Anguilla anguilla* exposed to fenitrothion (Sancho et al., 1997). These findings corroborate with the results from our study, where glycogen levels after 2,4-D exposure were reduced in the white muscle tissue. In agreement with our study, glycogen stores were reduced only in white muscle tissue and enhanced in the liver after

clomazone exposure (Crestani et al., 2006). The liver lactate reduction observed in this study may be related to a glycogen synthesis.

The protein content of mucous layer composition in silver catfish increased and glucose reduced after exposure to both 2,4-D concentrations tested (Figure 3). Similar results were obtained from glyphosate exposure to *Leporinus obtusidens* at the concentrations differs were increased low sugar and protein contents (Gluszczak et al., 2007b). The mucous layer has an important protective role on protecting fish against general stressor agents. 2,4-D exposure altered the basic mucous layer composition and consequently enhanced susceptibility of silver catfish to diseases (Tromeur et al., 1992).

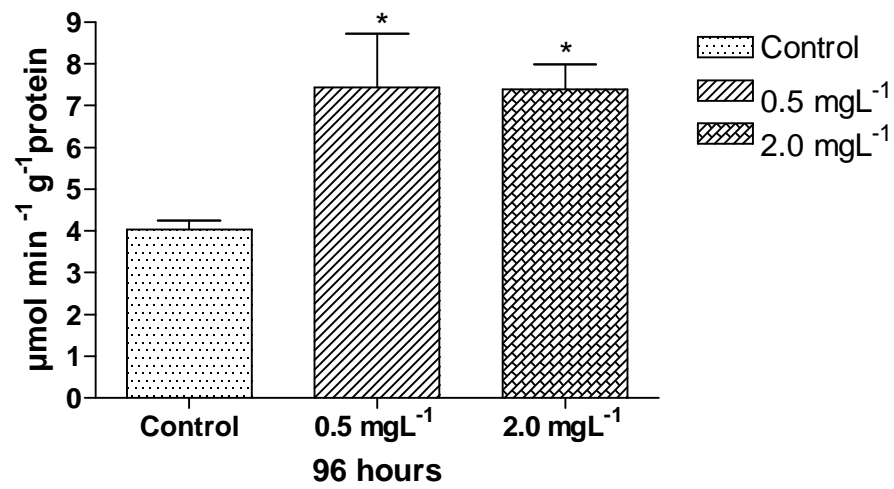
This results indicate that sub-lethal doses of 2,4-D may have deleterious effects on silver catfish. In conclusion, the results obtained indicate that 2,4-D affects tissue metabolic parameters, and cause liver oxidative stress in silver catfish, probably due to stress generated by its toxicity. In addition, the present data can be used to monitor 2,4-D presence in water. Studies for complete elucidation of 2,4-D induced fish toxicity will be the purpose of future research.

Table 1. Hepatic, white muscle, kidney and plasma metabolites of *Rhamdia quelen* exposed to different concentrations of 2,4-D for 96 hours.

Tissue	2,4-D (mgL ⁻¹)	Metabolic parameter			
		Glycogen (glycosyl-glucose g ⁻¹)	Glucose (μmol g ⁻¹)	Lactate (μmol g ⁻¹)	Protein (mg g ⁻¹)
Liver	Control	106.0 ± 3.0	25.5 ± 1.4	7.2 ± 1.8	263.0 ± 28.0
	0.5	129.0 ± 6.2*	25.7 ± 1.0	5.5 ± 0.7*	200.0 ± 40.0*
	2.0	133.0 ± 8.7*	23.9 ± 0.9	5.4 ± 1.3*	200.0 ± 31.0*
Muscle	Control	2.4 ± 0.2	6.3 ± 1.4	10.2 ± 2.2	249.0 ± 34.0
	0.5	2.0 ± 0.1*	5.7 ± 1.1	7.7 ± 1.6*	262.0 ± 20.0
	2.0	1.9 ± 0.2*	5.3 ± 1.7	8.0 ± 1.7*	237.0 ± 11.0
Kidney	Control	11.2 ± 1.6	13.5 ± 1.2	4.3 ± 0.8	155.0 ± 24.0
	0.5	10.9 ± 1.6	13.9 ± 3.1	2.6 ± 0.6*	177.0 ± 19.0
	2.0	11.8 ± 1.2	15.1 ± 2.4	2.7 ± 0.3*	159.0 ± 33.0
Plasm		Glucose	Lactate	Protein	
	Control	37.6 ± 6.4	4.6 ± 0.6	56.1 ± 8.4	
	0.5	35.3 ± 10.0	2.6 ± 1.1*	55.8 ± 9.0	
	2.0	32.8 ± 9.3	3.2 ± 1.2*	57.6 ± 12.0	

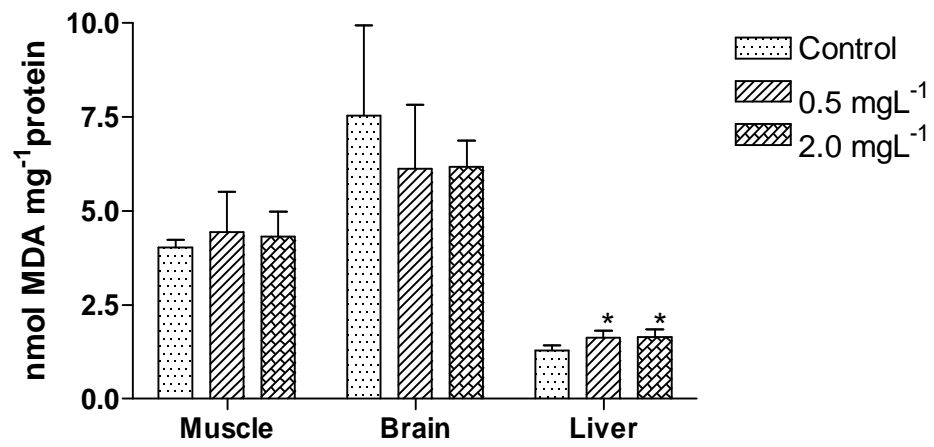
Values were expressed as mean ± standard deviation (SD). * Indicate significant differences from control values (p≤0.05) (n=24).

Fig. 1. Catalase activity in the liver of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed 96 hours to two concentrations a commercial formulation of 2,4-D. Values are means \pm SD (n=24). Data are expressed as $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$



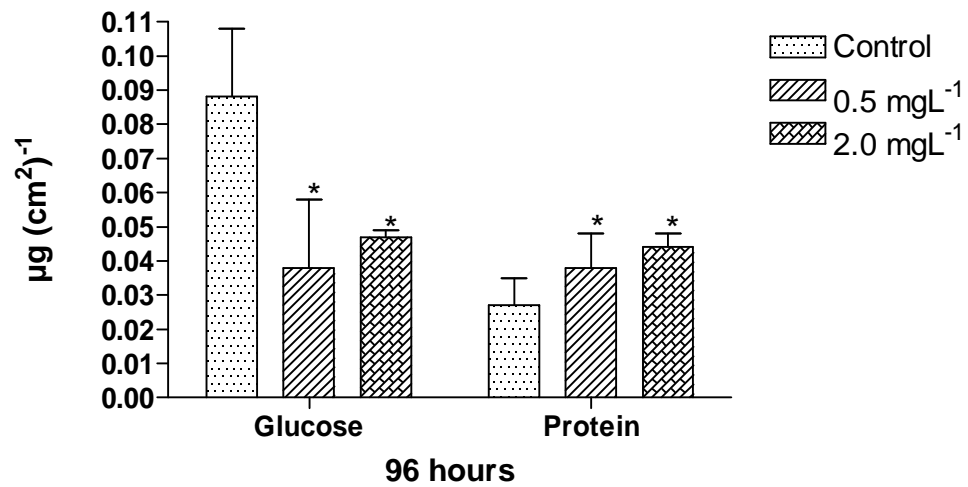
* Indicates difference between treatments and the control by Tukey test at $P \leq 0.05$.

Fig. 2. TBARS levels in brain, liver and white muscle of silver catfish exposed to 0.5 and 2.0 mgL⁻¹ 2,4-D for 96 hours. Data represent the mean \pm SD, (n=24).



* Indicates difference between treatments and the control by Tukey test at $P \leq 0.05$.

Fig. 3. Protein and glucose levels of the mucus layer of silver catfish after acute exposure (96 hours) to 2,4-D. Data represent the mean \pm SD, (n=24).



* Indicates difference between treatments and the control by Tukey test at $P \leq 0.05$.

4 References

- Aguiar, L.H., Moraes, G., Avilez, I.M., Altran, A.E., Corrêa, C.F., 2004. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. *Environ. Res.* 95, 224-230.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Lacerda, L.A., Terra, S., 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) and hormonal and biochemical changes after acute stress. *Aquac. Res.* 34, 1465-1469.
- Begum, G., Vijayaraghavan, S., 1999. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environ. Res.* 80, 80-83.
- Bidinotto, P.M., Souza, R.H.S., Moraes, G., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Tec. CEPTA. Pirassununga* 10, 53-60.
- Bradford, M.M.A., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brethead S., Toutant J.P., Saglio P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117-124.
- Chingombe, P., Saha, B., Wakeman, R.J., 2006. Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benazolin from water. *J. Coll. Interf. Sci.* 297, 434-442.
- Colby, S. R., Lym, R. G., Hill, E. R., Mc Avoy, W. J., Kitchen, L. M., Prasad, R., 1989. *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*. 6th ed. Illinois.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D., Lazzari, R., Duarte, M., Morsch, V. M., Pippi, A., Vieira, V. L., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate

- metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 48-55.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, dos S. D., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, Loro, V.L., 2007. Effects of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver satfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosph.* 67, 2305-2311.
- Duboie, M.G., Gilles, K.A, Hamilton, J.K., Roberts, P.A, Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-358.
- Fernández-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 2002. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pest. Biochem. Physiol.* 72, 55-63.
- Fonseca, M.B., Gluszczak, L., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Gonçalves, F.F., Loro, V.L., 2007. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.08.006.
- Gallagher, E., Di Giulio, R., 1991. Effects of 2,4-D dichlophenoxyacetic acid and picloran on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicol. Let.* 57, 65-72.
- Gill, T. S., Pande, J., Tevari, H., 1991. Individual and combined toxicity of common pesticides to teleost *Puntius conchonus* Hamilton. *Ind. J. Exp. Biol.* 29, 145-148.
- Gluszczak, L., Miron, D. S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007a. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol.* Doi: 10.1016/j.J.CBPC.2007.06.004.
- Harrower, J.R., Brown, C.H., 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.* 32, 709-711.
- Li, W.; Yin, D.; Zhou, Y.; Hu, S.; Wang, L. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, v. 56, p. 251-255, 2003.

- Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Far, A.L., Randal, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Nelson, D.P. & Kiesov, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Anal. Biochem.*, v. 49, p. 474-478, 1972.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, v. 95, p. 351-358, 1979.
- Oruç, E., Üner, N., 1999. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environ. Pollut.* 105, 267-272.
- Oruç, E., Sevgiler, Y., Üner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp. Biochem. Physiol. Part 137*, 43-51.
- Park, J.T., Johnson, M.J., 1949. A submicro determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 181,149-151.
- Parvez, S., Raisuddin, S, 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharm.*, v.20, p. 112-117.
- Primel, E.G; Zanella, R. ; Kurz, M H S ; Gonçalves F F ; Machado, S L de O ; Marchezan, E., 2005. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Química Nova.* 28, 4, 605-609.
- Rodrigues, B.N. & Almeida, F.S., 2005. Guia de Herbicidas. 5ª ed. Londrina 592 pp.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 1997. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 57-65.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Fernández, C. and Andreu, E., 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 168-175.

Sevgiler, Y., Oruç, E.O., Üner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pest. Biochem. Physiol.* 78, 1-8.

Tromeur, F., Guerard, F., Gal, Y.L., 1992. Mucous glycoprotein from the ray *Raja batis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102b, 773-778.

Üner, N., Oruç, E., Sevgiler, Y., 2005. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharm.*, v. 20, p. 99-106.

4. DISCUSSÃO:

O presente estudo mostra que a exposição prolongada ao 2,4-D causa redução em alguns parâmetros do crescimento, indicando que nas condições de laboratório este herbicida afeta o desempenho produtivo dos jundiás. Resultados semelhantes foram obtidos em exposição prolongada (90 dias) ao herbicida glifosato, onde piavas mostraram redução em até 50% nos parâmetros de crescimento (Salbego, 2005). Existem poucos estudos avaliando os efeitos de pesticidas sobre o crescimento de peixes, os dados obtidos neste estudo podem ser comparados somente com as condições de laboratório, uma vez que em condições naturais outros fatores podem interferir na biodisponibilidade do herbicida, bem como aumentar sua diluição. A exposição subletal ao herbicida 2,4-D reduz os valores de açúcares redutores do muco, e aumenta a produção de proteína após os períodos de 90 dias de exposição e 96 horas. O muco representa uma importante barreira contra agentes estressores, diminui o atrito com a água, tendo um papel fundamental nos mecanismos de proteção de peixes (Tromeur et al., 1992). A exposição ao herbicida 2,4-D parece interferir na composição básica do muco, deixando o peixe mais susceptível a doenças.

Diferentes classes de poluentes ambientais podem alterar o estado metabólico do tecido hepático devido a este órgão ser muito importante para o metabolismo e também o responsável pelo processo de detoxificação. Neste estudo após a exposição de 90 dias ao 2,4-D os peixes exibiram alterações no conteúdo de glicogênio, proteína, lactato e glicose. Na exposição aguda (96 horas) as respostas foram um pouco diferentes, mas ocorreram também alterações nos parâmetros metabólicos. Os resultados mostram que a redução de proteína nos tecidos provavelmente está relacionada ao consumo de proteína dos tecidos a fim obter energia para os processos metabólicos e de detoxificação do organismo. A redução dos níveis de lactato nos tecidos pode indicar uma estratégia gliconeogênica e poderia ser uma resposta à depleção de energia. A redução de glicogênio nos tecidos após exposição a pesticidas é relatada em muitos estudos. Geralmente, os peixes utilizam o estoque de glicogênio quando ocorre uma situação de hipóxia tecidual gerada pela

exposição a pesticidas (Sancho et al., 1998; Oruç & Üner, 1999; Aguiar et al., 2004). O aumento nos níveis de lactato dos tecidos pode indicar que o peixe está usando uma estratégia fermentativa, consumindo glicogênio e glicose a fim de obter energia de maneira mais rápida. Por outro lado, quando este se encontra reduzido, pode-se dizer que isto está relacionado com a síntese de glicose e glicogênio, favorecendo o processo de gliconeogênese. O tecido renal é de muita importância por auxiliar na excreção desses tóxicos ou seus metabólitos. Após a exposição prolongada ao 2,4-D o tecido renal apresentou redução nos níveis de glicose e glicogênio, bem como aumento nos valores de lactato. Neste tecido, não ocorreu alteração nos níveis de proteína. Jundiás expostos por 96 horas ao herbicida citado tiveram redução nos valores de lactato no tecido renal, porém não sofreram alterações nos demais parâmetros analisados. Os resultados referentes ao rim na literatura são escassos, porém podemos inferir que o 2,4-D muda parâmetros metabólicos neste tecido. O decréscimo observado no glicogênio do músculo, fígado e rim neste estudo podem indicar que o estresse causado pelo herbicida está acompanhado por uma dependência na degradação oxidativa do glicogênio. Em peixes, o sangue é bastante sensível quando estes são expostos a poluentes ambientais. Neste estudo escolhemos parâmetros gerais e indicativos secundários de estresse como glicose e lactato. Os resultados obtidos parecem indicar uma drenagem do lactato do sangue para contribuir com a gliconeogênese hepática. A redução de proteína no plasma pode indicar uma resposta compensatória à toxicidade do herbicida. Resultado semelhante referente à redução de proteína plasmática já foi relatado em vários estudos em peixes intoxicados com diferentes pesticidas. Uma alta demanda de energia pode levar à estimulação do catabolismo de proteínas (Sancho et al., 1998, 2000, Gluszczak et al., 2006).

Os resultados descritos para os níveis de TBARS indicam que ocorre estresse oxidativo no tecido hepático em 96 h de exposição e no tecido muscular em 90 dias. De maneira semelhante a este estudo, ocorre aumento nos níveis de TBARS em jundiás expostos ao herbicida clomazone durante 12-192h (Crestani et al., 2007). A atividade da enzima do sistema antioxidante catalase aumentou em ambos tempos experimentais, indicando uma resposta do peixe ao estado de estresse oxidativo gerado pela exposição ao herbicida. A resposta do TBARS parece ser tecido-específica, e varia também com a classe

do herbicida e tempo de exposição (Moraes et al., 2007, Gluszczak et al., 2007a). Diversos autores relatam as determinações dos níveis de TBARS e da enzima catalase como indicadores de estresse oxidativo em organismos aquáticos após exposição a poluentes ambientais (Oruç et al., 2004; Gluszczak et al., 2007a; Moraes et al., 2007). Oruç & Üner (2000) demonstraram que tilápias *Oreochromis niloticus* após exposição subletal ao 2,4-D ou ao inseticida azinphosmethyl, bem como o efeito combinado de ambos não teve alterações nos níveis de TBARS e na atividade da catalase após 24, 48, 72 e 96 horas de exposição. Este mesmo grupo de estudos relatou aumento na atividade da catalase em carpas (*Cyprinus carpio*) no tecido do rim, não detectando alterações para tilápias (*Oreochromis niloticus*), os níveis de TBARS não estiveram alterados em nenhum tecido de ambas as espécies neste experimento, onde foram expostas por 96 horas aos pesticidas 2,4-D e azimphosmethyl, bem como a sua combinação. Estes resultados podem estar indicando que outros componentes enzimáticos ou não enzimáticos do sistema de defesa antioxidante podem estar atuando na detoxificação do organismo. Outros experimentos do nosso laboratório indicam que a atividade da catalase aumentou após exposição prolongada (30 dias) aos herbicidas clomazone e propanil (Moraes et al., 2007). O somatório destes resultados parece indicar que o 2,4-D interfere no metabolismo dos tecidos de jundiás, e em alguns tecidos promove estresse oxidativo, representado pelo aumento do TBARS. Os parâmetros analisados podem ser utilizados como indicadores primários de toxicidade ao 2,4-D. Outros estudos são necessários para elucidar os mecanismos de toxicidade deste herbicida em peixes.

5. CONCLUSÕES:

- A exposição prolongada ao herbicida 2,4-D, em condições de laboratório, reduz o crescimento de jundiás (*Rhamdia quelen*).
- Exposição crônica (90 dias) e aguda (96 h) ao herbicida 2,4-D causam alterações na composição básica do muco, representada pelos conteúdos de glicose e proteína, em jundiás expostos as concentrações sub-letais. Este resultado sugere que o herbicida pode deixar o peixe mais susceptível a doenças.
- Intermediários metabólicos, como glicose, lactato, glicogênio e proteína de diferentes tecidos de jundiás são alterados quando estes organismos são expostos ao herbicida 2,4-D indicando que o peixe usa mecanismos compensatórios na tentativa de metabolizar o pesticida.
- Jundiás após exposição crônica ou aguda ao herbicida 2,4-D desenvolvem uma situação de estresse oxidativo no fígado. Esta situação é indicada pelo aumento da catalase, bem como a peroxidação lipídica que ocorre em alguns tecidos. O herbicida leva a um desbalanço entre a atividade antioxidante e a formação de espécies reativas de oxigênio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C. T.; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 58, p. 220-226, 2004.

AGUIAR, L. H.; MORAES, G.; AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; CORRÊA, C. F. Metabolical effects of Folidol 600 on neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environ. Res.**, v. 95, p. 224-230.

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: An in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). **Chemosph.**, v. 65, p. 952-962, 2006.

ALMROTH, B. C.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FÖRLIN L. Oxidative damage in ellpout (*Zoarces viviparous*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquat. Toxicol.**, v. 73, p. 171-180, 2005.

BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. Criação de jundiá. Santa Maria: **Ed. UFSM**. 232 pp, 2004.

BANERJEE, B. D.; SETH, V.; BHATTACHARYA, A.; PASHA, S. T.; CHAKRABORTY, A. K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical Scavengers. **Toxicol. Lett.** V. 107, p. 33-47, 1999.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R. M.; CERICATO, L.; CONRAD, J.; SOSO, A. B.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) and hormonal and biochemical changes after acute stress. **Aquac. Res.** V. 34, p. 1465-1469, 2003.

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Environ. Res.** V. 80, p. 80-83, 1999.

BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. **Aquat. Toxicol.** V. 66, p. 83-92, 2004.

BENLI, A. Ç. K.; SARIKAYA, R.; SEPICI-DINCEL, A.; SELVI, M.; SAHIN, D.; ERKOÇ, F. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pestic. Biochem. Physiol.** V. 88, p. 296-299, 2007.

BUKOWSKA, B.; HUTNIK, K. 2,4-D and MCPA and their derivatives: Effect on the activity of membrane erythrocytes acetylcholinesterase (in vitro). **Pest. Biochem. Physiol.** V. 85, p. 174-180, 2006.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, S. D.; LAZZARI, R.; DUARTE, F. M.; MORSCH, M. V.; PIPPI, L. A.; VIEIRA, P. V. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** V. 65, p. 48-55, 2006.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, S. D.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, V.L. Effects of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosph.** v. 67, p. 2305-2311, 2007.

FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIerno, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** Doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.08.006, 2007.

GALLAGHER, E.; DI GIULIO, R. Effects of 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid and picloran on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Toxicol. Lett.** V. 57, p. 65-72, 1991.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity, metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** V. 65, p. 237-241, 2006.

GLUSCZAK, L.; 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*). **Comp. Biochem. Physiol.** Doi: 10.1016/j.J.CBPC.2007.06.004, 2007a.

GLUSCZAK, L.; LORO, V. L.; MORAES, B. S.; RAABE, A.; PRETTO, A.; FONSECA, M. B.; MENEZES, C. C. Acute exposure of Roundup® affects oxidative parameters in piavas (*Leporinus obtusidens*). In press, 2007b.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciê. Rur.** V. 30, p 179-185, 2000.

GOTO, S.; TAKAHASHI, R.; NAKAMOTO, H. Aging and Oxidized Proteins: Generation and Degradation. **J. Clin. Biochem. Nutr.** V. 35, p. 53-61, 2004.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUATRACHUE, M.; SAHAPHONG S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci. As.** V. 28, p. 121-127, 2002.

JYOTHI, B.; NARAYAN, G. Certain pesticide- induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). **Food Chem. Toxicol.** V. 37, p. 417-421, 1999.

KEEN, P. L.; HIGGS, D. A.; HALL, K. J.; IKONOMOU, M. Effects of dietary exposure of 4-nonylphenol on growth and smoltification of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Sci. Tot. Environ.** V. 349, p. 81-94, 2005.

LAZZARI, R.; NETO, J. R.; EMANUELLI, T.; PEDRON, F. A.; COSTA, M. L.; LOSEKANN, M. E.; CORREIA, V.; BOCHI, V. C. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciê. Rur.** V. 36, p. 240-246, 2006.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSEROTTO, B.; MORAES, G.; MORSCH, V. M. Effects of different temperature regimes on metabólic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquac.** V. 239, p. 497-507, 2004.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; PASCARIELLO, M. F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T. Integrated use of biomarkers (acetilcolinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus*

galloprovincialis and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Mar. Poll. Bull.** V. 46, p. 324-330, 2003.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. **Mar. Poll. Bull.** V. 42, p. 656-666, 2001.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp. Biochem. Physiol.** V. 143, p. 141-149, 2006.

MORAES, B. S.; LORO, V. L.; GLUCKSZAC L.; PRETTO, A.; MENEZES, C. C.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S. O. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosph.** V. 68, p. 1597-1601, 2007.

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*. **Environ. Pollut.** V. 105, p. 267-272, 1999.

ORUÇ, E. Ö.; ÜNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.** V. 127, p. 291-296, 2000.

ORUÇ, E. Ö.; SEVGILER, Y.; ÜNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp. Biochem. Physiol. Part.** v. 137, p. 43-51, 2004.

PAN, G.; DUTTA, H. M. The inhibition of Brain Acetylcholinesterase Activity of Juvenile Largemouth Bass *Micropterus salmoides* by Sublethal Concentrations of Diazinon. **Environ. Res.** V. 79, p. 133-137, 1998.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R. ; KURZ, M. H. S. ; GONÇALVES F. F.; MACHADO, S. L. O. ; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Quím. Nova.** V. 28, 4, p. 605-609, 2005.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F.S. Guia de Herbicidas. 5ª ed. Londrina 592 pp, 2005.

SALBEGO, J. Efeitos do herbicida glifosate sobre o crescimento, enzimas digestivas e parâmetros toxicológicos em piavas (*Leporinus* sp). Dissertação (Mestrado em Zootecnia). **Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.** 48pp, 2005.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDREU, E. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** V. 41, p. 168-175, 1998.

SANCHO, E.; FERNANDEZ-VÉGA, C.; SANCHEZ, M.; FERRANDO, M. D.; ANDREU-MOLINER, E. Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-Contaminated Water. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** V. 46, p. 57-63, 2000.

SARIKAYA, R.; SELVI, M. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on larvae and adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Environ. Toxicol. Pharm.** v. 20, p. 264-268, 2005.

SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ANZILIERO, D.; LIMA, M.; SILVA, L. B.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. Chronic exposure to sub-lethal concentration of glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and effects reproduction of female jundiá (*Rhamdia quelen*). **Environ. Toxicol. Pharm.** V. 23, p. 308-313, 2007.

SZAREC, J.; SIWICKI, A.; ANDRZEJEWSKA, A.; TERECH-MAJEWSKA, E.; BANASZKIEWICZ, T. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Mar. Environ. Res.**, v. 50, p. 263-266, 2000.

TROMEUR, F.; GUERARD, F.; GAL, Y. L. Mucous glycoprotein from the ray *Raja batis*. **Comp. Biochem. Physiol.** V. 102b, p. 773-778, 1992.

ÜNER, N.; ORUÇ, E.; SEVGILER, Y. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. **Environ. Toxicol. Pharm.**, v. 20, p. 99-106, 2005.