



UFSM

Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO HERBICIDA CLOMAZONE SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E ANTIOXIDANTES EM
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

Márcia Crestani

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**EFEITOS DO HERBICIDA CLOMAZONE SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E ANTIOXIDANTES
EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

por

Márcia Crestani

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

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2004

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

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

**EFEITOS DO HERBICIDA CLOMAZONE SOBRE
PARÂMETROS METABÓLICOS E ANTIOXIDANTES
EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*)**

elaborada por

Márcia Crestani

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Vânia Lucia Pimentel Vieira
(Presidente/Orientadora)

Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Dr. Leonardo José Gil Barcellos

Santa Maria, 10 de setembro de 2004.

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes, porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas, só nos obriga a ser conscientes.

Problemas para vencer, liberdade para provar.

E, enquanto acreditamos em nossos sonhos, nada é por acaso.”

(Henfil)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Wilson e Neli Maria Crestani,
pelo exemplo de luta e
persistência.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nos dar uma inteligência para tentar desvendar os mistérios, por nos mostrar um mundo novo a cada dia, por nos dar oportunidades infinitas de dizer MUITO OBRIGADA!

À minha família, por sempre apoiar as minhas decisões e me incentivar a prosseguir frente às dificuldades, pelo exemplo de responsabilidade e dignidade.

À minha orientadora, Prof^a. Vânia Vieira, pela disponibilidade de me ensinar os primeiros passos no laboratório, pelos ensinamentos, pela amizade, pela confiança, muito obrigada!

À minha co-orientadora, Prof^a. Vera Maria Morsh, por ter me aceito no seu grupo de trabalho quando cheguei, pela atenção, disponibilidade e ensinamentos.

À Prof^a. Maria Rosa, Prof^o. Miguel e demais professores da pós-graduação, muito obrigada pela atenção e ajuda.

Ao meu noivo Marcos, pelo amor, apoio, incentivo, e principalmente, compreensão e paciência nesse período em que tive que me dedicar a esse trabalho.

À amiga Rosiele, irmã de coração, através de quem comecei a trabalhar na bioquímica, por todo apoio, incentivo, amizade, não tenho palavras suficientes para agradecer.

Aos amigos do laboratório, Bibiana, Lissandra, Carol, Denise, Alexandra, Jose, Charlene, Milene, Vera, Rafael, Fábio, por toda ajuda e amizade durante esse período de convívio.

Aos colegas do curso de mestrado, obrigada pela amizade e companheirismo, em especial à amiga Lissandra.

À minha bolsista de iniciação científica Charlene, pelo auxílio no desenvolvimento do meu trabalho, pela dedicação e pela amizade.

À amiga Rosélia, obrigada pela ajuda na realização da parte histológica do meu trabalho.

Ao Rafael, Fábio e pessoal da piscicultura, pelo trabalho em me fornecerem os jundiás, muito obrigada.

À farmacêutica e colega Marta Duarte, pelo auxílio na área hematológica.

Aos professores Maria Rosa Schetinger e Leonardo José Barcellos, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À UFSM e ao curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica, pela oportunidade.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos os amigos e pessoas que de alguma forma me ajudaram,
MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1.0 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	4
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	6
2.2 Rizipiscicultura.....	7
2.3 Clomazone.....	9
2.4 Atividade da enzima acetilcolinesterase.....	10
2.5 Parâmetros hematológicos.....	12
2.6 Parâmetros metabólicos.....	14
2.7 Enzimas aminotransferases.....	16
2.8 Estudo histológico.....	17
2.9 Peroxidação lipídica e sistema antioxidante.....	18
2.10 Capacidade de Recuperação.....	20
3.0 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	22
3.1. Artigo 1. Márcia Crestani, Charlene Menezes; Rosélia Spanevello, Aron Silveira, Vera Maria Morsch, Fábio Ferreira Gonçalves, Renato Zanella, Vânia Lúcia Pimentel Vieira. Biochemical and histological	

evaluation of effects of clomazone herbicide in silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) and recovery period.....	23
3.2. Artigo 2. Márcia Crestani, Charlene Menezes, Lissandra Gluszczak, Rafael Lazzari, Marta F. Duarte, Denise dos Santos Miron, Vera Maria Morsch, Vânia Lúcia Pimentel Vieira. Effects of clomazone herbicide on some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>).....	47
4.0 DISCUSSÃO.....	74
5.0 CONCLUSÕES.....	80
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
7.0 ANEXOS.....	95
Anexo 1 – Exemplares de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	95

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABLE 1. Brain and muscle specific AChE activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) of *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone for 12, 24, 48, 96 and 192 hours of exposure and recovery periods for 96 and 192 hours.....37

TABLE 2. TBARS levels (nmol MDA/mg of protein) in brain and liver of *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone for 12, 24, 48, 96 and 192 hours of exposure and recovery periods of 96 and 192 hours.....38

ARTIGO 2

TABLE 1. Biochemical changes in liver tissue of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 hours.....58

TABLE 2. Biochemical changes in muscle tissue of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 hours.....59

TABLE 3. Changes in metabolic and hematological parameters: glucose, protein, lactate, hematocrit and hemoglobin in silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 hours.....60

TABLE 4. Changes in metabolic and hematological parameters: glucose, protein, lactate, hematocrit and hemoglobin in silver catfish *Rhamdia quelen* after recovery periods of 96 and 192 hours.....61

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 – Estrutura do herbicida clomazone.....10

ARTIGO 1

FIGURE 1. Catalase activity ($\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ of protein) in liver of *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone herbicide for 12, 24, 48, 96 and 192 h of exposure and recovery periods of 96 and 192 h in clean water.....34

FIGURE 2. Histological analysis of liver of *Rhamdia quelen* from the control group.....35

FIGURE 3. Histological analysis of liver of *Rhamdia quelen* from fish exposed to 1.0 mg/L clomazone for 192 h.....35

FIGURE 4. Histological analysis of liver of *Rhamdia quelen* after recovery period of 192 h of fish exposed to 0.5 mg/L (A) and 1.0 mg/L (B) of clomazone.....36

ARTIGO 2

FIGURE 1. Alterations in ALT (A) and AST (B) activities in plasma of *Rhamdia quelen* during exposure to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 h and recovery response after periods of 96 and 192 h in clean water.....62

FIGURE 2. Alterations in ALT (A) and AST (B) activities in the liver of *Rhamdia quelen* during exposure to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 h and recovery response after periods of 96 and 192 h in clean water.....63

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CaCO₃ – Carbonato de cálcio

CAT – Catalase

CL₅₀ – Concentração letal média

LPO – Peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados

ROS – Espécies reativas do oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITOS DO HERBICIDA CLOMAZONE SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E ANTIOXIDANTES EM JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

Autora: Márcia Crestani

Orientadora: Vânia Lucia Pimentel Vieira

Data e local da defesa: Santa Maria, 10 de setembro de 2004.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do herbicida clomazone sobre o metabolismo do jundiá (*Rhamdia quelen*). Foram medidos os níveis de lactato, proteína e glicose (plasma), glicogênio, proteína e lactato (fígado e músculo), atividade da enzima AChE (cérebro e músculo), atividade da enzima catalase (fígado), formação de TBARS (fígado e cérebro), valores de hematócrito e hemoglobina, atividade das enzimas aminotransferases (AST e ALT) (fígado e plasma) e análise histológica do tecido hepático. Os peixes foram expostos a 0.5 e 1.0 mg/L de clomazone por 12, 24, 48, 96 e 192 horas. Estas concentrações são utilizadas nas lavouras de arroz. Alguns parâmetros foram também medidos após 96 e 192 horas em água sem o herbicida (períodos de recuperação) após 96 e 192 horas de exposição. Os níveis de glicogênio muscular e lactato hepático estavam reduzidos, assim como o valor do hematócrito, após o período experimental. O conteúdo de hemoglobina não se alterou significativamente. Os níveis de lactato diminuíram no tecido muscular. O glicogênio hepático, glicose e lactato no plasma estavam aumentados após exposição ao herbicida. Os níveis de proteína estavam aumentados no fígado e músculo, exceto nos últimos tempos de exposição, enquanto a proteína no plasma aumentou a partir de 48 até 96 horas de exposição ao herbicida. A atividade específica da AChE diminuiu no cérebro e músculo após os tratamentos. A atividade da catalase foi reduzida em todos os períodos de exposição. Os peixes expostos ao clomazone aumentaram a produção de TBARS no fígado, enquanto no cérebro os peixes apresentaram diferentes respostas com o aumento do tempo de exposição. A atividade das aminotransferases estava elevada no plasma, enquanto no fígado, a ALT aumentou somente nos períodos iniciais. A atividade da AST no fígado estava aumentada após 12 horas de exposição, e após 48 horas, sua atividade reduziu significativamente. A análise histológica demonstrou vacuolização nos hepatócitos após 192 horas de exposição ao herbicida na concentração de 1,0 mg/L. Entretanto, no período de recuperação de 192 horas, a vacuolização foi observada em ambas concentrações testadas do clomazone. A maioria das desordens metabólicas não persistiu após o período de recuperação, exceto as atividades da AST e ALT hepáticas. O presente trabalho mostra que as concentrações de clomazone utilizadas nas lavouras de arroz podem causar mudanças no estado metabólico do peixe, às quais são de moderada intensidade e geralmente reversíveis.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program on Toxicological Biochemistry
Universidade Federal de Santa Maria

**EFEITOS DO HERBICIDA CLOMAZONE SOBRE PARÂMETROS
METABÓLICOS E ANTIOXIDANTES EM JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**
(EFFECTS OF CLOMAZONE HERBICIDE ON METABOLIC AND ANTIOXIDANT
PARAMETERS IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*))

Author: Márcia Crestani

Adviser: Vânia Lucia Pimentel Vieira

Place and date of defense: Santa Maria, September 10th, 2004.

The objective of this study was to evaluate the effect of clomazone herbicide on metabolism of silver catfish (*Rhamdia quelen*). It was measured levels of lactate, protein and glucose (plasma), glycogen, protein and lactate (liver and muscle), acetylcholinesterase (AChE) activity (brain and muscle), catalase activity (liver), TBARS formation (liver and brain), hematocrit and hemoglobin values, aminotransferases (AST and ALT) activities (liver and plasma) and histological analysis of hepatic tissue. Fishes were exposed to 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone for 12, 24, 48, 96 and 192 h. These concentrations are used in rice fields. Some parameters were also assayed after 96 h and 192 h in water without herbicide (recovery periods) after 96 and 192 h of exposure. Levels of muscle glycogen and liver lactate were reduced as well as hematocrit value after experimental period. Hemoglobin content did not changed significantly. Lactate levels diminished in the muscle tissue. Liver glycogen, glucose and lactate in the plasma were enhanced after exposure to herbicide. Protein levels were enhanced in the liver and white muscle, except at last periods of exposure, while plasma protein increased from 48 to 96 h of exposure to the herbicide. Specific AChE activity decreased in brain and muscle after treatments. Catalase activity was reduced in all periods of exposure. Fishes exposed to clomazone increased TBARS production in the liver, while in the brain the fishes showed different responses with exposure period increasing. Aminotransferases activities were elevated in the plasma, while in the liver, ALT increased in the early periods only. Liver AST activity was enhanced after 12 h of exposure, and after 48 h its activity reduced significantly. Hepatic histological analysis presented hepatocyte vacuolation after 192 h of exposure to herbicide concentration of 1.0 mg/L. However, in recovery period of 192 h, hepatocyte vacuolation was observed in both clomazone concentration tested. Most of the metabolic disorders did not persist after recovery period, except to liver AST and ALT activities. The present work shows that clomazone concentrations used in rice fields can cause changes in metabolic state of the fish, which are of moderate intensity and generally reversible.

1. INTRODUÇÃO

Os herbicidas são utilizados na agricultura para o controle de plantas daninhas. Existe a possibilidade de ocorrência de altas concentrações de herbicidas logo depois de chuvas abundantes em lavouras recentemente tratadas e próximas de pequenos córregos. Devido a sua natureza tóxica, estes produtos podem causar sério impacto no ecossistema aquático, exercendo efeitos adversos em vários organismos, incluindo peixes (Oruç & Üner, 1999; Carr & Chambers, 1996).

O clomazone é um herbicida amplamente utilizado em lavouras de arroz no sul do Brasil com boa eficácia contra gramíneas invasoras de culturas (Jonsson & Maia, 1998). Atualmente o cultivo de peixes associado à cultura de arroz, ou seja, rizipiscicultura, vem sendo utilizado em escala crescente, e parece ser uma alternativa para a redução dos custos da lavoura arroteira. A cultura do peixe reduz o manejo e o uso de maquinaria, conservando o meio ambiente, podendo ainda ser possível comercializar o peixe (Cotrin, 2000). O jundiá, *Rhamdia quelen*, poderia ser utilizado nesse sistema de rizipiscicultura, uma vez que esta espécie de peixe é nativa, adapta-se bem a diferentes ambientes, é muito utilizada em viveiros de piscicultura e possui boa aceitação no mercado consumidor. Além disso, seu cultivo vem crescendo progressivamente no sul do Brasil (Gomes *et al.*, 2000). Esta espécie de peixe pode alcançar 600-800 g de peso corporal em 8 meses (Barcellos *et al.*, 2004). No entanto,

estudos relacionados à toxicidade de herbicidas em peixes nativos do Brasil, especialmente em relação ao clomazone, são escassos.

Os peixes podem apresentar várias respostas do organismo devido à exposição a componentes tóxicos como os herbicidas. O tempo de exposição e a concentração à qual os peixes são expostos ao herbicida podem influenciar na intensidade das alterações observadas em decorrência do efeito tóxico (Oruç & Üner, 1999). Essas respostas aparecem como variações nos níveis de parâmetros metabólicos, enzimáticos, comportamentais, entre outros (Fernández-Vega *et al.*, 2002; Jyothi & Narayan, 1999).

Um dos parâmetros utilizados para avaliar a toxicidade de pesticidas e herbicidas é a medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). A medida da atividade de colinesterases vem sendo muito utilizada como bioindicadora de toxicidade por organofosforados e carbamatos em peixes (Dembelé *et al.*, 1999; Sancho *et al.*, 2000). Trabalhos recentes utilizando a atividade da enzima AChE verificaram que esta enzima pode ser afetada também por herbicidas de outras classes (Dutta & Arends, 2003; Bretaud *et al.*, 2000).

Alterações fisiológicas causadas em peixes devido à toxicidade de herbicidas podem ser avaliadas através do estudo de parâmetros metabólicos, como teor de glicogênio, lactato, glicose e proteína nos diferentes tecidos (Jyothi & Narayan, 1999; Oruç & Üner, 1999). As medidas de parâmetros hematológicos também são consideradas bons indicadores de toxicidade em organismos terrestres e aquáticos (Cerón *et al.*, 1995; Sancho *et al.*, 2000).

Os efeitos tóxicos de diferentes contaminantes ambientais, em peixes, podem estar relacionados com a formação de radicais livres (Li *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2000). Considerando o exposto acima, torna-se importante estudar os níveis de peroxidação lipídica, bem como a atividade de enzimas do sistema antioxidante.

Alterações no metabolismo hepático são observadas com frequência em organismos expostos a contaminantes. Um possível dano ao fígado pode ser avaliado quando são verificadas alterações na atividade de enzimas, como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (Asztalos *et al.*, 1988; Aguiar *et al.*, 2001). Alterações na estrutura do tecido hepático podem ser visualizadas pelo estudo histológico (Poleksic & Karan, 1999).

Algumas alterações observadas devido à ação tóxica dos herbicidas podem ser revertidas (Sancho *et al.*, 1998; Begum, 2004). No entanto, há poucos estudos relacionando os efeitos tóxicos e a recuperação para níveis normais quando os peixes são submetidos a um tratamento em água livre de herbicida após a exposição. Não há trabalhos nesse sentido utilizando o herbicida clomazone em jundiás *Rhamdia quelen*. Desta forma torna-se importante estabelecer se efeitos tóxicos são observados em jundiás expostos a concentrações subletais do herbicida clomazone. O conhecimento dos efeitos desse herbicida nessa espécie e possíveis mecanismos adotados pelo animal para compensar o estresse provocado pelo herbicida proporcionará dados importantes para o seu cultivo e possível uso no sistema de rizipiscicultura.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar alguns efeitos do herbicida clomazone, nas concentrações próximas das utilizadas nas lavouras de arroz, em tecidos de jundiás *Rhamdia quelen*.

1.1.2 Objetivos específicos:

1. Verificar se as concentrações utilizadas do clomazone alteram a atividade da enzima AChE cerebral e muscular de jundiás;
2. Avaliar os efeitos do herbicida clomazone sobre alguns parâmetros hematológicos dos jundiás, através do estudo do hemograma e dos níveis de glicose, lactato e proteína plasmáticos;
3. Verificar se o herbicida clomazone afeta alguns parâmetros metabólicos (glicogênio, lactato e proteína) no tecido hepático e muscular de jundiás;
4. Determinar os níveis de peroxidação lipídica pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em cérebro e fígado de jundiás;

5. Investigar uma possível resposta antioxidante, gerada pelo clomazone, através da avaliação da atividade da enzima catalase em fígado de jundiás;
6. Verificar se as concentrações utilizadas do herbicida alteram a atividade das enzimas ALT e AST hepáticas e plasmáticas, sugerindo dano hepático em jundiás.
7. Observar, através de estudo histológico, se o herbicida clomazone, nas concentrações utilizadas, promove alterações estruturais no tecido hepático dessa espécie de peixe;
8. Verificar se as possíveis alterações observadas no organismo dos peixes após a exposição ao herbicida podem ser recuperadas a níveis normais, submetendo os animais a tratamento em água livre de herbicida, após a exposição.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México. No Brasil, está presente na região da Depressão Central do Rio Grande do Sul (Guedes, 1980), entre outros locais.

Dentre as espécies nativas do Rio Grande do Sul, o jundiá, *Rhamdia quelen*, está se destacando como uma das mais promissoras para o cultivo, pois apresenta crescimento rápido com fácil adaptação ao manejo em criações intensivas. O crescimento do jundiá é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida. Esta espécie suporta águas frias no inverno e cresce rápido durante o verão. Quando cultivado a uma densidade de 2 a 4 peixes/m², o jundiá pode alcançar o peso de 600-800 g em 8 meses (Barcellos *et al.*, 2004). O comprimento teórico máximo das fêmeas é de aproximadamente 66,5 cm e dos machos de 52,0 cm. As fêmeas apresentam um tempo de vida teórico de 21 anos e os machos de 11 anos. Sua coloração varia de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia. É conhecido também como jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca. Na Argentina, é conhecido como bagre, bagre negro, bagre sapo e bagre sul-americano (Weis, 1980; Gomes *et al.*, 2000) (Anexo 1).

O jundiá possui hábito omnívoro, com uma preferência por crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. Esse peixe vive em lagos e poços fundos dos rios, esconde-se entre pedras e

troncos apodrecidos, junto às margens e vegetação. Essa espécie possui hábitos noturnos, saindo à noite desses locais, à procura de alimento (Guedes, 1980).

2.2 Rizipiscicultura

A piscicultura apresenta-se como uma grande potencialidade na aqüicultura, tanto do ponto de vista da sustentabilidade ecológica como nutricional e econômica. No Brasil, estima-se que no ano de 2000 a piscicultura tenha produzido 132.988,5 toneladas e destas, 2.546,0 toneladas são de jundiá, tornando-a a quinta espécie nativa mais cultivada no Brasil (Ibama, 2001).

Segundo Radünz Neto (1981), o jundiá apresenta boa aceitação no mercado consumidor, boa produtividade em açudes e apresenta alto potencial de comercialização, tornando-se uma ótima opção para a piscicultura.

Essa espécie de peixe poderia ser utilizada com grandes vantagens no sistema de rizipiscicultura, que vem a ser o cultivo de peixes associado à cultura de arroz irrigado. Atualmente esse sistema vem sendo utilizado em escala crescente, e parece ser uma alternativa para a redução dos custos da lavoura arrozeira. A cultura do peixe prepara o solo para o próximo cultivo, recicla a matéria orgânica e consome sementes de plantas invasoras contidas no solo. O peixe também consome larvas de insetos, caramujos, sementes de arroz perdidas na colheita e restos culturais da lavoura que são focos de fungos, sem consumir as plantas de arroz. Portanto, o peixe reduz o

manejo e o uso de maquinaria, conservando o meio ambiente, podendo ainda ser possível comercializá-lo (Cotrin, 2000).

Segundo Cotrin *et al.*, (2001), a rizipiscicultura é um sistema auto-sustentável de tecnologia limpa, sem o uso de agrotóxicos. É inegável a importância dos herbicidas na atividade agrícola com o intuito de controlar as plantas daninhas e garantir um maior rendimento da produtividade. Porém, os impactos do uso sem controle desses produtos em culturas irrigadas, como nas lavouras de arroz, podem afetar diretamente ou indiretamente a vida de muitos organismos não-alvos expostos aos mesmos. Nesse sistema de rizipiscicultura, os peixes são diretamente atingidos pelos produtos aplicados na cultura de arroz, uma vez que ficam em contato direto com a água da lavoura.

Estudos prévios foram realizados nesta espécie para verificar as concentrações letais medianas (CL_{50}) e testar a resistência destes peixes aos herbicidas utilizados em lavouras de cultivo de arroz. O valor da CL_{50} (96 horas) em jundiás expostos ao herbicida clomazone foi de 7,32 mg/L (Miron *et al.*, 2004). A dose de aplicação recomendada, desse herbicida, para culturas de arroz irrigado é de 0,4-0,7 Kg/ha (0,4 -0,7 mg/L). Outros estudos mostraram que o crescimento de alevinos de jundiá não se altera em 45 dias de cultivo em águas de lavouras de arroz com os herbicidas clomazone, quinclorac e metasulfuron-metil (dados não publicados). Este estudo poderá fornecer um embasamento para a utilização dessa espécie de peixe na rizipiscicultura, mesmo em lavouras que estejam usando herbicida.

2.3 Clomazone

A aplicação de pesticidas na agricultura e em áreas localizadas nas proximidades de áreas alagáveis tem resultado na toxicidade de muitas espécies aquáticas, incluindo peixes. Existe a possibilidade de ocorrência de altas concentrações de herbicidas logo depois de chuvas abundantes em lavouras recentemente tratadas e próximas de pequenos córregos (Bretaud *et al.*, 2000).

O clomazone (2-(2-clorofenil)metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona) é um herbicida amplamente utilizado em lavouras de arroz no sul do Brasil com boa eficácia contra gramíneas invasoras de culturas (Jonsson *et al.* 1998). Também é indicado para as culturas de soja, cana-de-açúcar, fumo e algodão. Resíduos do herbicida foram detectados em 90% das amostras de água coletadas a partir de rios das regiões de cultivo de arroz (Zanella *et al.*, 2002). Este produto possui grande solubilidade na água (1100 mg/L) e meia-vida de 28 a 84 dias, dependendo do tipo de solo e do nível de matéria orgânica (Colby *et al.*, 1989).

O clomazone pertence ao grupo químico das isoxazolidinonas e apresenta a estrutura abaixo (Figura 1). Este composto é encontrado na forma comercial de concentrado emulsionável 36 ou 50% (GAMIT[®], COMMAND 4EC[®]). Seu mecanismo de ação é a inibição da biossíntese dos compostos isoprenóides precursores do pigmento fotossintético, determinando redução do nível de caroteno e fitol e, conseqüentemente, de clorofila. Uma vez que o caroteno protege a clorofila da destruição pela luz solar, o modo de ação do produto

torna-se bi-direcional, inibindo a produção de clorofila e a produção de pigmentos protetores da mesma. As plantas emergem brancas, por falta de clorofila, morrendo em pouco tempo (Rodrigues & Almeida, 1998).

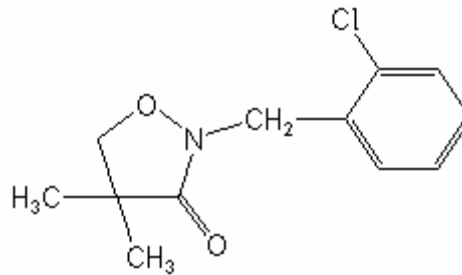


Figura 1. Estrutura do Clomazone.

A avaliação dos efeitos do herbicida clomazone (Gamit) sobre o desenvolvimento inicial de jundiás evidenciou que os alevinos desta espécie não apresentaram sinais aparentes de intoxicação que refletisse negativamente no ganho de peso, comprimento e crescimento específico (dados não publicados). Segundo Oruç & Üner, (1999), a intensidade das alterações observadas como consequência do efeito tóxico de herbicidas pode ser influenciada por alguns fatores, como o tempo de exposição e a concentração à qual os peixes são expostos ao composto. No entanto, estudos visando à toxicidade de herbicidas em peixes nativos do Brasil, especialmente em relação ao clomazone, são escassos.

2.4 Enzima Acetilcolinesterase

As colinesterases são enzimas amplamente distribuídas entre os animais. Há dois tipos destas enzimas: acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE; E.C.3.1.1.8). Cada uma

delas tem suas características e propriedades particulares que permitem distingui-las uma da outra (Massoulie *et al.*, 1993). Estudos de colinesterases em peixes foram iniciados em 1943, quando Mendel & Rudney (1943) demonstraram que carpas (*Cyprinus carpio*) possuem apenas AChE cerebral, e não BChE. Outros trabalhos também relataram a presença apenas de AChE em várias espécies de peixes (Gaal *et al.*, 1980; Kozlovskaya *et al.*, 1993; Chuiko, 2000).

A enzima AChE é responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina (ACh), regulando seus níveis no sistema nervoso central, nas junções neuromusculares e nas sinapses simpáticas. Se ocorrer inibição desta enzima, o neurotransmissor ACh não vai ser hidrolizado, causando uma excessiva estimulação de nervos colinérgicos. Isso pode levar, conseqüentemente, a diversos efeitos comportamentais no peixe, tais como hiperatividade, tremores, convulsões, aumento na frequência respiratória, letargia, nado errático e morte (Bretau *et al.*, 2000; Roex *et al.*, 2003). Como conseqüência da inibição da AChE e das mudanças comportamentais, alterações no metabolismo energético também podem ser observadas. Gupta & Srivastava (1982) sugeriram que a hiperglicemia induzida por pesticidas poderia ser explicada em parte pela inibição da AChE, onde a quantidade aumentada de ACh estimularia a quebra de glicogênio em glicose.

Sabe-se que o mecanismo de ação de pesticidas organofosforados e carbamatos é a inibição das enzimas colinesterases. A medida da inibição da AChE está sendo utilizada como biomarcadora para avaliar a toxicidade em organismos não-

alvos a contaminantes ambientais. Isso está bem documentado para herbicidas organofosforados e carbamatos (Roex *et al.*, 2003; Fernández-Vega *et al.*, 2002; Sancho *et al.*, 2000). Herbicidas de outras classes também foram capazes de alterar a atividade da enzima AChE (Dutta & Arends, 2003; Bretauud *et al.*, 2000; Szegletes *et al.*, 1995). Estudos realizados com concentrações do herbicida clomazone próximas as da CL₅₀, determinaram inibições de até 90% na atividade da enzima AChE em cérebro e músculo de jundiás (dados não publicados). Em vista disso, torna-se importante verificar o efeito do herbicida clomazone, nas concentrações utilizadas na lavoura de arroz, sobre a atividade da enzima AChE no jundiá, *Rhamdia quelen*.

2.5 Parâmetros Hematológicos

As enfermidades, de modo geral, estão relacionadas às alterações do hemograma. Por isso, o quadro hematológico de diferentes peixes vem sendo estudado (Tavares-Dias *et al.*, 2002). O estudo da hematologia em peixes contribui, ainda, para a compreensão da fisiologia comparativa, relação filogenética, condições alimentares e outros parâmetros ecológicos (Larson *et al.*, 1976). Parâmetros do sangue, como o conteúdo de hemoglobina e hematócrito, podem indicar respostas ao estresse fisiológico. Sancho *et al.*, (2000) sugere que a redução no conteúdo desses parâmetros pode refletir um estado anêmico severo relacionado à exposição ao herbicida. No entanto, esse não seria um efeito agudo e necessitaria de pelo menos sete dias para ser induzido. Aumentos no conteúdo de hemoglobina e

hematócrito também podem ser observados após exposição a pesticidas (Aguiar *et al.*, 2001).

O sangue reflete todos os processos do corpo, indicando sua condição geral e possíveis falhas metabólicas. Sabe-se que o estresse ambiental causa várias mudanças detectáveis no sangue e tecidos do peixe (Roche & Bogé, 2000; Jyothi & Narayan, 1999). Por isso, parâmetros hematológicos do peixe são cada vez mais utilizados nos estudos toxicológicos e de monitoramento ambiental.

O estresse é um mecanismo de compensação fisiológica que o organismo adota em resposta a fatores físicos ou químicos, os quais são os agentes estressores (Sancho *et al.*, 1998). Parâmetros hematológicos são muito utilizados como indicadores de estresse fisiológico em peixes submetidos a variações do meio ambiente (Das & Mukherjee, 2003; Sancho *et al.*, 2000).

Variações nos níveis de glicose, lactato e proteína plasmáticos são geralmente observadas em peixes expostos a contaminantes ambientais, como os herbicidas (Das & Mukherjee, 2003; Sancho *et al.*, 1998). A variação na concentração de glicose plasmática pode indicar mudanças no metabolismo dos carboidratos nos tecidos, como o aumento da glicogenólise no tecido hepático (Sancho *et al.*, 1998). Os níveis de lactato tem sido muito utilizados como medida do metabolismo anaeróbico, uma vez que o aumento no metabolismo anaeróbico parece ser uma resposta rápida para a depleção de energia causada pela falta de oxigênio que ocorre após exposição a componentes tóxicos (Oruç & Üner, 1999; Van den Thillart & Smith, 1984). Já os níveis de proteína plasmática alterados podem indicar

uma adaptação fisiológica do peixe para compensar a situação de estresse, uma vez que ele vai necessitar de uma demanda maior de energia, e isso pode levar à estimulação do catabolismo de proteínas (Sancho *et al.*, 1998).

2.6 Parâmetros Metabólicos: Glicogênio, Glicose, Lactato e Proteína

Vários autores descrevem alterações fisiológicas observadas em peixes como resposta à exposição a herbicidas (Jyothi & Narayan, 1999; Oruç & Üner, 1999; Gimeno *et al.*, 1995). Essas respostas ocorrem quando o componente tóxico entra no organismo e podem ser tanto adaptativas, como podem indicar toxicidade (Begum, 2004).

Bidinotto *et al.*, (1997) sugerem que o conteúdo de glicogênio pode refletir uma adaptação bioquímica a qualquer tipo de estresse ambiental. Alguns autores propõem que para suprir a demanda de energia aumentada dos peixes em situação de estresse, o glicogênio, pela sua grande capacidade para produção de energia, é rapidamente catabolizado, resultando em grandes perdas dessa reserva de energia (Sancho *et al.*, 1998; Gimeno *et al.*, 1995). Alguns hormônios, como as catecolaminas e corticosteróides, são ativos no metabolismo de carboidratos. O aumento nos níveis de catecolaminas após inibição da enzima AChE, observado em animais expostos a contaminantes, poderia, através do sistema da adenilato ciclase, aumentar o nível de AMP cíclico, afetando a atividade de enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogênio (Sastry & Siddiqui, 1982).

O fígado é um órgão que utiliza, produz e estoca glicose. Assim, ele age como uma bomba de glicose nos organismos vertebrados, regulando os níveis dessa substância no sangue (Moon, 1998). A maior parte da glicose intracelular em hepatócitos de peixes é convertida em glicogênio (Pereira *et al.*, 1995).

Os pesticidas e herbicidas são capazes de induzir uma condição de hipóxia nos peixes. Nessa condição, vai estar favorecido o metabolismo anaeróbico como um caminho rápido para suprir a demanda de energia, uma vez que a oxidação aeróbica vai estar reduzida (Begum & Vijayaraghavan, 1999; Oruç & Üner, 1999). A capacidade de um tecido suportar uma alta taxa de glicólise anaeróbica dependerá das características intrateciduals, do conteúdo de glicogênio e das concentrações de enzimas glicolíticas requeridas para degradar o glicogênio a lactato e manter o balanço redox anaeróbico (Somero & Childress, 1980).

Alterações no metabolismo de proteínas são observadas em peixes expostos à situação de estresse ambiental. Fernández-Vega *et al.*, (2002) sugerem que a redução no conteúdo de proteína no tecido hepático e muscular indica uma adaptação fisiológica do peixe para compensar a situação de estresse. Outros autores observaram aumento na síntese de proteínas. Segundo esses autores, o peixe exposto ao pesticida pode compensar uma possível perda de proteínas aumentando sua síntese (Sahib *et al.*, 1984).

2.7 Enzimas Aminotransferases

As aminotransferases (ou transaminases) são enzimas mitocondriais e citosólicas envolvidas no catabolismo de aminoácidos. Durante o estado catabólico de proteínas, a reação das aminotransferases está próxima do ou no equilíbrio, onde qualquer aumento ou diminuição na concentração de aminoácidos no plasma provoca aumento ou diminuição na sua velocidade de degradação. Essa propriedade é particularmente relevante durante flutuações de energia do peixe em situações adaptativas devido a efeitos adversos do ambiente (Wendelaar Bonga, 1997).

As transaminases são as enzimas responsáveis pela remoção dos grupos α -amino dos aminoácidos que chegam ao fígado. Essas enzimas catalisam a seguinte reação de transaminação:



O efeito das reações de transaminação é coletar os grupos amino de muitos aminoácidos diferentes na forma de apenas um, o L-glutamato. O glutamato conduz os grupos amino para serem utilizados por vias biossintéticas ou para uma seqüência de reações pelas quais são formados produtos nitrogenados para serem excretados. As células contêm várias aminotransferases diferentes, muitas específicas para o α -cetogluturato como receptor do grupo amino. As aminotransferases diferem na sua especificidade pelo aminoácido que cede o grupo amino (Lenhinger *et al.*, 2002).

O fígado é o centro metabólico de detoxificação e um dano ao tecido hepático pode ser confirmado por alterações nas atividades da

aspartato aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1) e da alanina aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2). Além disso, se ocorrer dano tecidual no fígado, vai resultar na liberação dessas enzimas para a corrente sanguínea, causando uma atividade aumentada delas no plasma (Oruç & Üner, 1999).

Alguns autores observaram variações nas atividades da AST e ALT no plasma e tecido hepático de peixes expostos a pesticidas (Begum, 2004; Oruç & Üner, 1999; Poleksíc & Karan, 1999). Segundo Bidigare & King (1981), a atividade aumentada das aminotransferases pode aumentar a transaminação, canalizando os aminoácidos livres para o ciclo do ácido cítrico para suprir a demanda de energia aumentada durante as condições de estresse impostas pelo herbicida.

2.8 Estudo Histológico

O fígado é um órgão essencial tanto para o metabolismo, quanto para excreção de substâncias tóxicas do corpo. A análise histológica é um parâmetro muito importante para a verificação de mudanças celulares que podem ocorrer em órgãos-alvo, como o fígado (Hinton *et al.*, 2001). Estudos relacionados à histologia do tecido hepático podem confirmar danos teciduais observados em peixes expostos a herbicidas. Em um estudo com altas concentrações de herbicida Roundup (205 e 410 mg/L) observou-se efeito patogênico em carpas (*Cyprinus carpio*) confirmado por análise histológica, o qual levou à morte dos peixes em apenas uma hora de exposição (Szarek *et al.*, 2000). Poleksíc & Karan (1999) observaram necrose nos hepatócitos

de carpas expostas ao herbicida trifluralin e expõem a importância de estudos histopatológicos, em conjunto a outros estudos, na medida de efeitos não letais de pesticidas em peixes. Trabalhos relacionados com a histologia de peixes são escassos na literatura.

2.9 Peroxidação Lipídica e Sistema Antioxidante

O elemento oxigênio se encontra em 53,8 % da crosta terrestre e constitui cerca de 21% da composição do ar. Este elemento é indispensável para a produção de energia nos animais e nas plantas. No entanto, assim como o oxigênio é indispensável para a vida, pode resultar em danos reversíveis ou até irreversíveis quando seres vivos são expostos a ele em concentrações superiores às encontradas na atmosfera, podendo, inclusive, levar à morte celular.

Nas células aeróbicas, espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, $RO\cdot$, $ROO\cdot$, etc., são geradas durante o metabolismo normal, como resultado do metabolismo oxidativo nas membranas mitocondriais. Esses radicais são produtos da redução parcial do oxigênio (Boveris & Bermúdez, 1996). Devido à alta reatividade dessas espécies, pode ocorrer dano a componentes de estrutura e função celular, como lipídios, carboidratos ou ácidos nucleicos, levando a modificações e/ou perda da função celular. Essa produção constante de radicais livres é contrabalançada com uma produção equivalente de mecanismos antioxidantes, visando neutralizar seus efeitos deletérios (Ahmad *et al.*, 2000). Analisando sob o ponto de vista fisiológico, um antioxidante é uma substância que protege as

células e componentes celulares de serem oxidados por ROS (Fraga *et al.*, 1996).

Quando a neutralização dos radicais livres não é possível devido a uma sobrecarga do mecanismo antioxidante, diz-se que há uma situação de estresse oxidativo. Várias classes de poluentes ambientais podem provocar estresse oxidativo em um grande número de organismos aquáticos, incluindo peixes, e levar a um aumento na produção de ROS (Sevgiler *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2000). Uma reação típica induzida por ROS envolve a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (LPO). A formação de LPO induzida por diferentes contaminantes ambientais tem sido observada em várias espécies de peixes (Sayeed *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003).

Os peixes, assim como os mamíferos, possuem mecanismos de defesa para neutralizar os efeitos deletérios de ROS (Winston, 1991). O sistema antioxidante inclui o sistema enzimático e o não-enzimático. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx). O sistema não-enzimático engloba antioxidantes hidrofílicos (glutathione reduzida (GSH), vitamina C, carotenos) e lipofílicos (vitamina A, vitamina E), entre outros (Winston & Di Giulio, 1991).

As enzimas antioxidantes são encontradas em todos os tecidos de vertebrados, mas mostram maior atividade no fígado, órgão de captação e transformação enzimática de ROS (Lemaire *et al.*, 1994). A catalase (EC 1.11.1.6) está localizada principalmente nos peroxissomas e é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio

produzido a partir do metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa (Winston & Di Giulio, 1991).

Alterações nas atividades de enzimas antioxidantes foram demonstradas em vários estudos com organismos aquáticos expostos a contaminação ambiental (Lionetto *et al.*, 2003; Sayeed *et al.*, 2003). Essas enzimas podem ser induzidas por um ligeiro estresse oxidativo devido a uma resposta compensatória. No entanto, um estresse severo pode suprimir as atividades dessas enzimas devido ao dano oxidativo e perda de mecanismos compensatórios (Zhang *et al.*, 2003).

São observadas grandes diferenças quantitativas nas defesas antioxidantes de diferentes espécies de peixe estudadas (Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Essas diferenças acabam dificultando a possibilidade de correlação entre a atividade das enzimas antioxidantes com aspectos fisiológicos do peixe (Winston, 1991).

2.10 Capacidade de Recuperação

Há muitos trabalhos que estão sendo realizados sobre os efeitos bioquímicos de vários pesticidas em diferentes espécies de animais aquáticos. No entanto, ainda há falta de informação relacionando os efeitos desses produtos durante a exposição e seguindo um período sem exposição, denominado período de recuperação.

Os maiores estudos sobre recuperação envolvem a atividade da enzima AChE. Sugere-se que o tempo necessário para recuperação da atividade depende de fatores, como: tipo de pesticida, espécie testada, extensão da depressão da atividade da enzima, concentração do

produto e tempo de exposição (Sancho *et al.*, 2000; Abdullah *et al.*, 1994). A inibição da atividade da enzima AChE por carbamatos é, geralmente, reversível, ou menos prolongada quando comparada à inibição por organofosforados (Dembelé *et al.*, 1999).

Begum (2004) observou que os conteúdos de proteína e glicogênio hepáticos, diminuídos após exposição ao inseticida carbofuran, continuavam reduzidos após três dias em água limpa. Por outro lado, Sancho *et al.*, (1998) observaram que a maioria das desordens metabólicas não persistiu após o período de recuperação em água limpa pelo máximo de 192 horas. Segundo esses autores, essas descobertas são muito importantes na medida do potencial tóxico de pesticidas no ambiente aquático e suas implicações nas populações de peixes, uma vez que estes pesticidas podem afetar o crescimento, reprodução e metabolismo geral dos organismos aquáticos.

3. Artigos Científicos

3.1 Artigo 1

Biochemical and Histological Evaluation of Effects of Clomazone Herbicide in Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) and Recovery Period

Márcia Crestani, Charlene Menezes; Rosélia Spanevello, Aron Silveira, Vera Maria Morsch, Fábio Ferreira Gonçalves, Renato Zanella, Vânia Lúcia Pimentel Vieira

Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

(artigo em fase de preparação para ser submetido à publicação na revista Archives of Environmental Contamination and Toxicology)

Author for correspondence:

Vania Lucia Pimentel Vieira

Department of Chemistry

Federal University of Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil

Phone: 55 –220-8053

e-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

The effects of the herbicide clomazone on acetylcholinesterase (AChE), antioxidant enzyme activity (catalase) and on TBARS formation in the teleost fish (*Rhamdia quelen*) were studied. Fishes were exposed to 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone for 12, 24, 48, 96 and 192 h. The same parameters were also assayed after 96 h and 192 h of exposition to clomazone followed by recovery periods in water without herbicide. Specific AChE activity was reduced in brain and muscle after treatments, reaching a maximum inhibition of 47% in brain and 45% in muscle after 12 h of exposure. Fishes exposed to clomazone increased TBARS production in the liver in all exposure periods, ranging from 30% to 175%. Brain presented elevated TBARS levels after 12 (43-66%), 24 (52-85%) and 48 h (22%), but after 96 and 192 h, these levels decreased (53 and 12%, respectively). The decrease in the TBARS levels persisted in the brain tissue (73%) after 96 h of recovery and returned to control value after 192 h in clean water. Catalase activity was reduced in all periods of exposure (12 – 46%). Histological analysis confirmed changes in the liver after herbicide exposure. After the recovery period, some alterations observed were completely restored. Present results evidence clomazone effect on TBARS production, antioxidant response, muscle and brain AChE and histology analysis.

Key Words: clomazone, herbicide, AChE, histology, silver catfish (*Rhamdia quelen*), recovery, TBARS, catalase.

Introduction

Several herbicides of different chemical structure are widely used in agriculture. Due to their widespread distribution and toxic nature, they may have a serious impact as reach aquatic environments. The clomazone herbicide (2-(2-chlorophenyl)methyl-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone) is widely used against weed in paddy rice fields at Southern Brazil (Jonsson et al. 1998). It is highly effective, but cause groundwater contamination due to their water solubility (1100 mg L^{-1}) and long half-life dissipation averaging from 28 to 84 days (Colby et al. 1989; Zanella et al. 2002). Clomazone residues can last for up to 130 days in agricultural water and were detected in 90% of water samples collected from rivers of the rice cultivation regions (Zanella et al. 2002)

Recently, it have been observed a great number of studies about biomarkers that reflect changes induced by environmental contamination in aquatic organisms (Sancho et al. 2000; Lionetto et al. 2003; Sayeed et al. 2003). Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) activity is one of the most frequently indicators used to verify herbicide and pesticide toxicity (Dembelé et al. 1999; Bretaud et al. 2000).

It is known that pesticides may induce formation of reactive oxygen species (ROS) (Ahmad et al. 2000; Sevgiler et al. 2004). This species are highly reactive and can cause damage to lipids, proteins, carbohydrates, or nucleic acids (Fraga et al. 1996). The typical reaction during ROS-induced damage involves the peroxidation of

unsaturated fatty acids. Lipid peroxidation (LPO) induced by pollutant as herbicides have been observed in several fish species (Schlenk et al. 1997; Ahmad et al. 2000). Variations in the activities of antioxidant enzymes have been proposed as indicators of pollutant mediated oxidative stress (Ahmad et al. 2000; Sayeed et al. 2003).

The liver is a detoxification organ and essential for both the metabolism and excretion of toxic substances in the body. Histological analysis appears to be a very sensitive parameter and is crucial in determining cellular changes that may occur in target organs, such as the liver (Hinton et al. 2001).

Rhamdia quelen is a commercial relevant species in fisheries of South Brazil. This species responds promptly to environmental changes. *Rhamdia quelen* show good productivity and it is acceptable on the consumer market. It can support cold winters and grows fast in the summer (Barcellos et al. 2004). This species also could be used associated in fish-rice fields where herbicides as clomazone are common. The effect of clomazone on native fish species is scarcely studied.

Thus the aim of this study was to verify clomazone-induced oxidative stress and its effects on enzymatic antioxidant system in *Rhamdia quelen*, together with measurement of AChE activity and hepatic histology. An attempt has also been to assess the influence of a recovery period in these parameters.

Material and methods

Chemicals

The herbicide used in this study was obtained of commercial source (Gamit - 36% purity) obtained from FMC Corporation (Philadelphia, EUA), dissolved in water. Acetylthiocholine, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), bovine serum albumin, Triton X-100, hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA), sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Fish

Juvenile *Rhamdia quelen* of both sexes with average weight of 45.0 ± 8.0 g and 17 ± 1.0 cm length, acquire from the University fish farm (UFSM), were acclimated to laboratory conditions for 10 days, in 250 L boxes, with aerated water and natural photoperiod (12 h light-12 h dark). Water conditions were: temperature $21 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, pH 7.6 ± 0.2 units, dissolved oxygen 6.4 ± 0.3 mg/L, non-ionized ammonia 0.007 ± 0.001 mg/L, nitrite 0.03 ± 0.01 mg/L, alkalinity 65 ± 5.4 mg/L CaCO₃ and hardness 20 ± 1.5 mg/L CaCO₃. All water parameters were determined according to Boyd and Tucker (1992). During acclimatizing, fish were fed one a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). During experimental period

fish were feeding each other 48 h. Sewage and pellet leavings were every other day removed by suction.

Experimental design

Previous experiments carried out in our laboratory established 7.32 mg/L as the LC₅₀ 96 h for clomazone (Miron et al., 2004). The concentration usually recommended in rice fields is of 0.4 to 0.7 mg/L of water (Rodrigues and Almeida 1998) and thus it was choosed clomazone concentrations of 0.5 and 1.0 mg/L for our experiments. After acclimation period, 45L glass boxes were stocked up with 6 fish per box. Stock solutions were prepared by dissolving clomazone in water. This solution was added into the experimental boxes. Two control boxes were filled with clean water for each experimental period and 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone were added to two series of ten boxes (duplicate). Fish were exposed at 12, 24, 48, 96 and 192 h to clomazone. Herbicide concentration was monitored every two days by high-performance liquid chromatography (HPLC) method to verify clomazone values in experimental box. Herbicide concentration in the water after 48 h was approximately 90% of the initial concentration (data not shown). The water in the boxes was renewed every 48 h to maintain the concentration of clomazone constant during the period of exposure. Water quality parameters during the treatment period were the same of acclimation period.

Sampling

After experimental period, fish were killed by punching of spinal cord behind opercula. Brain, white muscle and liver samples were rapidly removed, washed in 150 mM saline solution, dried with filter paper, packed in Teflon tubes and kept at -4°C for analyses of AChE and catalase activities and lipid peroxidation levels. One portion of the fresh liver was separated for histological analysis. Two series (duplicate) of four extra boxes with 6 fishes per box were used to recovery periods as follow. After exposure to both clomazone concentrations, fishes were kept in water without herbicide for 96 and 192 h to recovery periods (after 96 and 192 h of exposure, respectively). Fishes were killed as just reported at the end of experiments and the tissues were collected for same analyses. Fish control boxes were sampled at the each experimental period.

AChE activity assay

Tissues samples (brain and muscle) were weighed and homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 150mM NaCl. The homogenates were centrifuged for 15 minutes at 3000 x *g* at 5°C and the supernatant was used as enzyme source. AChE (EC 3.1.1.7) activity was measured as described by Ellman et al (1961) and modified by Villescas (1981). Aliquots of supernatant (50 to 100µl) (brain and muscle respectively) were incubated at 25°C for two minutes with 0.1M phosphate buffer pH 7.5, 1mM DTNB as chromogen and distilled water. After 2 min, the reaction was initiated by addition of acetylthiocholine (0.08M) as substrate to the reaction

mixture. The final volume was 2.0ml. Absorbances were determined using a HITACHI spectrophotometer at 412nm during 2 min. The enzyme activity was expressed as μmol of acetylthiocholine (ASCh) hydrolyzed per minute per milligram of protein.

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 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (with 0.1% Triton X-100 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 using a HITACHI spectrophotometer. Catalase activity was calculated in terms of $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ protein.

Lipid Peroxidation levels

Peroxides produced from oxidative stress can be quantified by TBARS assay. This is performed by malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which is optically measured. Tissues samples (brain and liver) were prepared as reported to catalase assay. Liver and brain homogenates (100-400 μL) were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M acetic acid (pH

3.4), 0.8% thiobarbituric acid and distilled water was added to adjust final volume to 2.0ml. 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 optical density at 532 nm determined. TBARS levels are expressed as nmols MDA per mg of protein according to Janero et al (1990) and Ohkawa et al (1979). Protein levels were spectrophotometrically estimated by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Histological analysis

For histological investigation, portions of the fresh liver were sampled, fixed in bouin solution and processed for histology examination using standard techniques with hematoxylin and eosin staining.

Statistical procedures

Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) to determinate concentration and time effects. Means were compared by Tukey test and expressed as mean \pm standard deviation. A *P* value < 0.05 was considered to be significant.

Results

Brain specific AChE activity (0.34-0.44 $\mu\text{mol ASCh}/\text{min}/\text{mg}$ protein) of control unexposed fish was higher than that of white muscle (0.16-0.28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) in *Rhamdia quelen*. After clomazone exposure AChE activity decreased significantly ($P < 0.05$) in both tissues (Table I). Clomazone inhibition reached a maximum of 47% in brain and 45% in muscle tissue. AChE activity inhibition was observed in all exposure periods, except to 192 h in the brain tissue. When the fishes were removed from exposition to clomazone for 96 and 192 h, it was observed significant recovery of brain AChE activity (Table I). Skeletal muscle AChE activity was recovered after 192 h in clean water only (Table I).

Fish exposed to clomazone herbicide enhanced lipid peroxidation particularly in liver (Table II). Increases of TBARS in this tissue were observed in all periods of exposure (30%-175%; $P < 0.05$). TBARS levels were significantly ($P < 0.05$) increased in the brain after 12 (43-66%), 24 (52-85%) and 48 h (22%) of exposure to herbicide. With exposure period increasing, reduction of lipid peroxidation was shown (53%-96h and 12%-192h; $P < 0.05$) in relation to control group. The decrease in the TBARS levels persisted in the brain tissue after 96 h of recovery ($P < 0.01$) and returned to control value after 192 h in water without herbicide (Table II). TBARS levels were recovered in the liver after both periods of recovery (Table II).

Changes in catalase activity in the liver of *Rhamdia quelen* are shown in figure I. At the early periods of exposure (12 and 24 h), the activity of enzyme was significantly inhibited (24 and 23%; $P < 0.05$) after exposure to 1.0 mg/L of clomazone. In other periods, this reduction was observed in both concentrations of herbicide ($P < 0.001$), reaching the maximum of 46% after 96 h exposure to 0.5 mg/L clomazone. After the recovery periods, the catalase activity returned to control values.

Histology analysis showed hepatocyte vacuolation after 192 h of exposure in the concentration of 1.0 mg/L of clomazone (Figure III). However, after 192 h in clean free of clomazone (recovery period), both concentrations tested showed the same effect (Figures IVA and IVB).

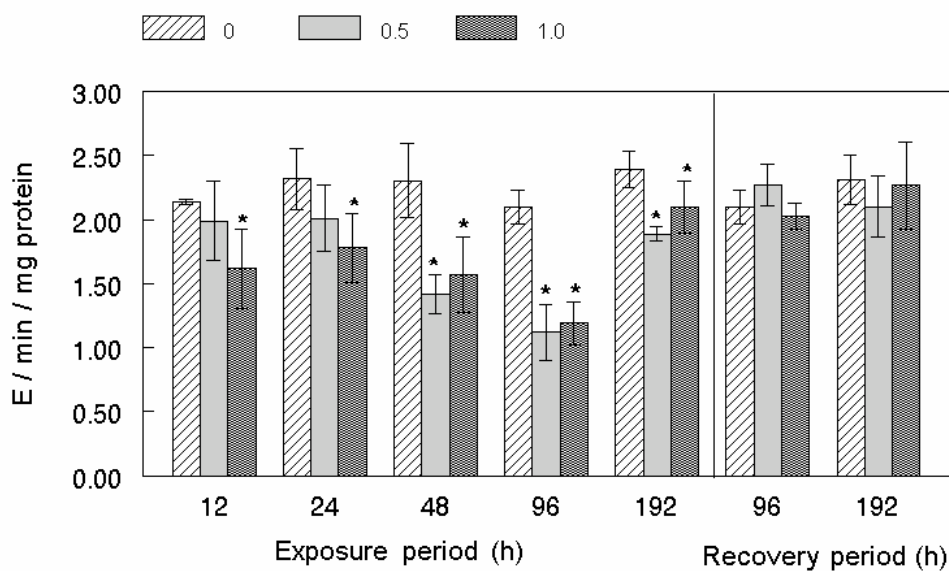


Figure I. Catalase activity ($\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ of protein) in liver of *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone herbicide for 12, 24, 48, 96 and 192 h of exposure and recovery periods of 96 and 192 h in clean water. Data are reported as mean \pm SD (n=12). * indicate significant difference from control ($P < 0.05$).

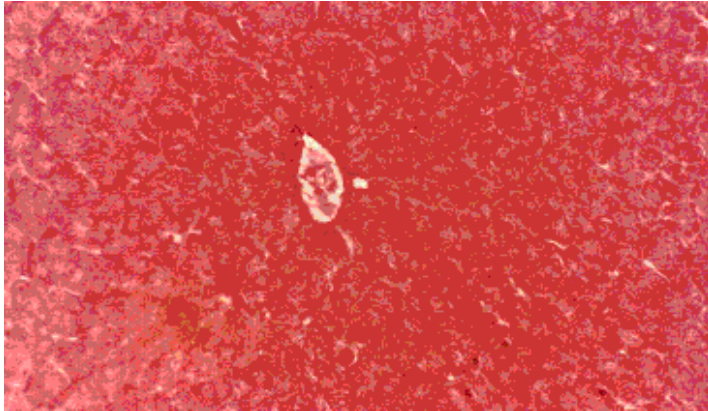


Figure II. Histological analysis of liver of *Rhamdia quelen* from the control group. HE, x 400. Central venule surrounded by hepatocytes.

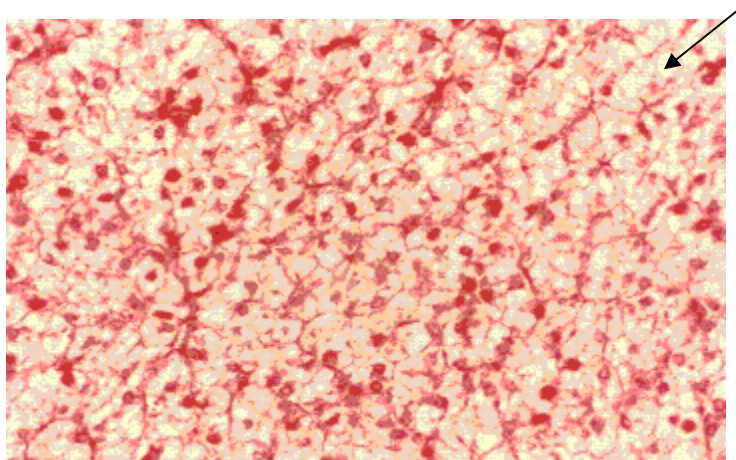
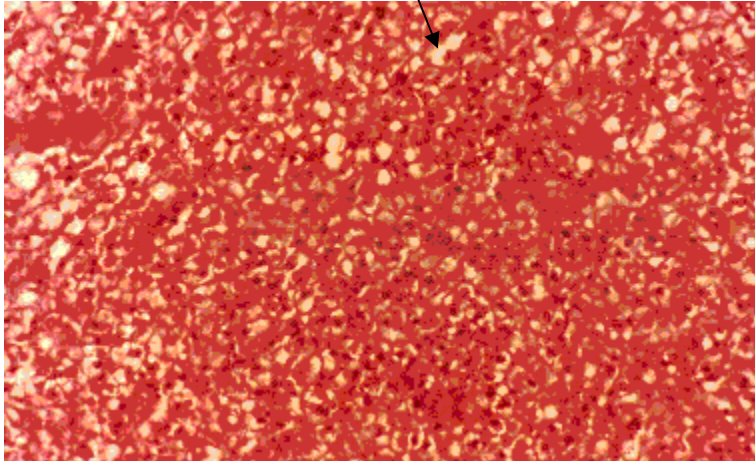


Figure III. Histological analysis of liver of *Rhamdia quelen* from fish exposed to 1.0 mg/L clomazone for 192 h. HE, x 400. Note hepatocyte vacuolation (white spaces indicated by arrow).

A)



B)

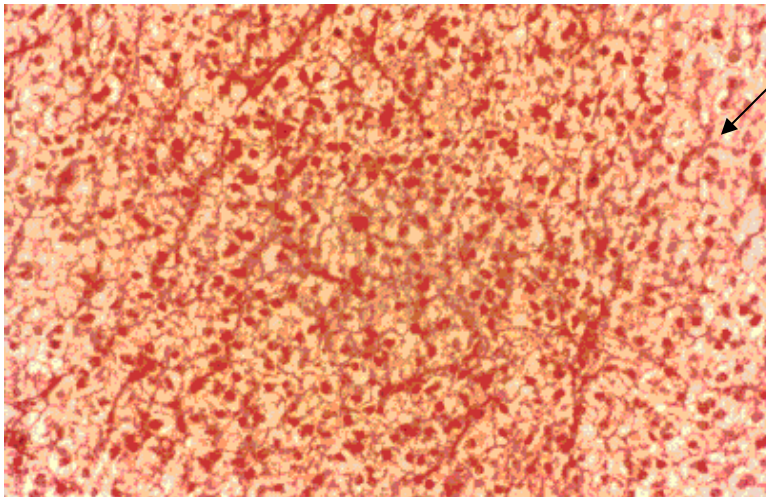


Figure IV. Histological analysis of liver of *Rhamdia quelen* after recovery period of 192 h of fish exposed for 192 h to 0.5 mg/L (A) and 1.0 mg/L (B) of clomazone. HE, x 400. Note hepatocyte vacuolation (white spaces indicated by arrow).

Table I. Brain and muscle specific AChE activity ($\mu\text{mol ASCh}/\text{min}/\text{mg protein}$) of *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone for 12, 24, 48, 96 and 192 hours of exposure and recovery periods of 96 and 192 hours.

Herbicide concentration	Exposure period (h)				
	12	24	48	96	192
Brain Tissue					
Control	0.40 \pm 0.04 ^{Aa}	0.39 \pm 0.03 ^{Aa}	0.38 \pm 0.04 ^{Aa}	0.38 \pm 0.02 ^{Aa}	0.38 \pm 0.04 ^{Aa}
0.5 mg/L	0.23 \pm 0.04 ^{Ba}	0.27 \pm 0.02 ^{Ba}	0.36 \pm 0.04 ^{Ab}	0.32 \pm 0.02 ^{Bb}	0.37 \pm 0.03 ^{Ab}
1.0 mg/L	0.21 \pm 0.03 ^{Ba}	0.27 \pm 0.04 ^{Ba}	0.25 \pm 0.02 ^{Ba}	0.27 \pm 0.03 ^{Ba}	0.47 \pm 0.06 ^{Ba}
Muscle Tissue					
Control	0.20 \pm 0.02 ^{Aa}	0.19 \pm 0.02 ^{Aa}	0.23 \pm 0.04 ^{Aa}	0.22 \pm 0.02 ^{Aa}	0.23 \pm 0.03 ^{Aa}
0.5 mg/L	0.11 \pm 0.02 ^{Ba}	0.14 \pm 0.01 ^{Bab}	0.16 \pm 0.02 ^{Bb}	0.13 \pm 0.02 ^{Bab}	0.21 \pm 0.03 ^{Ab}
1.0 mg/L	0.12 \pm 0.01 ^{Ba}	0.13 \pm 0.02 ^{Bab}	0.14 \pm 0.02 ^{Bab}	0.16 \pm 0.02 ^{Bb}	0.18 \pm 0.01 ^{Bb}
Recovery period (h)					
	Brain Tissue		Muscle Tissue		
	96	192	96	192	
Control	0.37 \pm 0.03 ^{Aa}	0.41 \pm 0.02 ^{Aa}	0.22 \pm 0.02 ^{Aa}	0.21 \pm 0.02 ^{Aa}	
0.5 mg/L	0.36 \pm 0.02 ^{Aa}	0.47 \pm 0.05 ^{Ab}	0.15 \pm 0.01 ^{Ba}	0.25 \pm 0.02 ^{Ab}	
1.0 mg/L	0.35 \pm 0.02 ^{Aa}	0.47 \pm 0.07 ^{Ab}	0.15 \pm 0.02 ^{Ba}	0.22 \pm 0.03 ^{Ab}	

Values are expressed as means \pm SD (n=12). Different majuscule letters indicate significant difference among exposure concentrations (column) and different minuscule letters indicate difference among exposure periods (line) (P< 0.05).

Table II. TBARS levels (nmol MDA/mg of protein) in brain and liver of *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone for 12, 24, 48, 96 and 192 hours of exposure and recovery periods of 96 and 192 hours.

Herbicide concentration	Exposure period (h)				
	12	24	48	96	192
Brain tissue					
Control	9.25 ± 0.91 ^{Aa}	10.70 ± 0.89 ^{Aa}	10.83 ± 1.02 ^{Aa}	11.57 ± .05 ^{Aa}	10.12 ± 1.06 ^{Aa}
0.5 mg/L	15.41 ± 1.44 ^{Ba}	16.28 ± 4.66 ^{Ba}	13.26 ± 2.35 ^{Bab}	9.99 ± .46 ^{Ab}	9.78 ± 0.59 ^{Ab}
1.0 mg/L	13.26 ± 2.62 ^{Bb}	19.80 ± 1.79 ^{Ba}	8.74 ± 1.13 ^{Ac}	5.46 ± .72 ^{Bd}	8.89 ± 0.71 ^{Bc}
Liver tissue					
Control	2.59 ± 0.23 ^{Aa}	2.85 ± 0.30 ^{Aa}	3.50 ± 0.69 ^{Aa}	2.52 ± 0.64 ^{Aa}	2.88 ±
0.5 mg/L	3.25 ± 1.00 ^{Ab}	6.00 ± 0.78 ^{Ba}	5.07 ± 1.03 ^{Bab}	3.25 ±	3.67 ±
1.0 mg/L	4.83 ± 0.78 ^{Bb}	7.85 ± 0.78 ^{Ba}	3.18 ± 0.32 ^{Ac}	2.22 ±	3.89 ± 0.44 ^{Bbc}
Recovery period (h)					
	Brain		Liver		
	96	192	96	192	
Control	10.40 ± 0.78 ^{Aa}	9.74 ± 0.90 ^{Aa}	2.52 ± 0.64 ^{Aa}	3.19 ± 0.60 ^{Aa}	
0.5 mg/L	7.87 ± 1.16 ^{Bb}	9.62 ± 0.66 ^{Aa}	2.55 ± 0.40 ^{Aa}	2.66 ± 0.43 ^{Aa}	
1.0 mg/L	2.78 ± 0.81 ^{Bb}	9.18 ± 1.01 ^{Aa}	2.38 ± 0.65 ^{Aa}	2.98 ± 0.52 ^{Aa}	

Values are expressed as means ± SD (n=12). Different majuscule letters indicate significant difference among exposure concentrations (column) and different minuscule letters indicate difference among exposure periods (line) (P< 0.05).

Discussion

Analysis of AChE activity in different tissues has been used as an indicator of exposure to certain groups of anticholinesterase contaminants such as organophosphates and carbamates (Cerón et al. 1996; Bretaud et al. 2000; Sancho et al. 2000). In our study, after clomazone exposure, AChE activity decreased significantly at all periods of exposure tested in both tissues, except in the brain tissue after the period of 192 h. Bretaud et al. (2000) observed AChE activity inhibition of 23% in skeletal muscle of *Carassius auratus* after 48 h of exposure to 50 µg/L of carbofuran. The activity of this enzyme is extremely important for many physiological functions as prey location, predator evasion, and orientation toward food. When AChE activity decreases, ACh is not broken and accumulates within synapses, causing overall decline in neural and muscular control (Dutta and Arends 2003).

There is a variety of studies about recovery after exposure to pesticides. Recovery is defined as a significant increase in AChE activity as a function of time that occurs following cessation of exposure to the anticholinesterase agent (Sancho et al. 1997). Dembélé et al. (1999) showed that brain AChE activity was almost completely recovered within one day after exposure to carbofuran (carbamate) and 15 days after exposure to chlorfenvinphos (organophosphate) in other freshwater fish, *Cyprinus carpio*. The time required to recover AChE activity varies with type of pesticide and fish species tested (Dembélé et al. 1999; Fernández-Vega et al. 2002).

Our study showed that specific brain AChE activity in silver catfish *Rhamdia quelen* was recovered after 96 h of exposure to clomazone and this period was not sufficient to recover muscle AChE inhibition. In this tissue, the time required to recover specific AChE activity was 192 h.

Exposure of fish to sublethal concentrations of clomazone herbicide resulted in suppression of antioxidant enzyme activity and TBARS levels enhanced. Aquatic pollution is a major contributor to oxidative stress mediated by reactive oxygen species (ROS) resulting from the redox cycling of pollutants (Ahmad et al. 2000).

In the present study, we observed a change of the TBARS levels in the brain and liver of silver catfish after clomazone exposure. The levels of TBARS enhanced in the liver in all periods of exposure, although this increased was not observed in both concentrations of herbicide. Lipid peroxidation has been used as a marker of oxidative stress. Other authors also observed elevated levels of lipid peroxidation induced by aquatic contaminants (Li et al. 2003; Sayeed et al. 2003). Li et al (2003) observed TBARS levels 73% increased in liver of crucian carp *Carassius auratus* exposed for 15 days to 0.4 mg/L of 3,4-dichloroaniline, a chemical used in the synthesis of herbicides. The level of lipid peroxidation may differ among fish species. Elasmobranchs produce higher levels of peroxides than seawater teleosts and this one present higher level than freshwater (Ahmad et. al. 2000). We also determined LPO levels in the brain tissue of silver catfish *Rhamdia quelen* and observed a variation in that levels. In the early periods of exposure to clomazone, there was

an increased of TBARS levels. However, after 96 and 192 h exposure, these levels decreased significantly at 1.0 mg/L of clomazone. This reduction in the TBARS levels in the later periods of exposure can indicate an attempt of adaptation to compensate herbicide induced oxidative stress. When the fish exposed to herbicide were transferred to water without clomazone for recovery period, the altered levels of TBARS returned to control values after 96 and 192 h (for liver and brain, respectively).

Catalase is an important antioxidant enzymatic defense and widely used as biomarker of exposure to aquatic pollutants (Ahmad et al. 2000; Lionetto et al. 2003). The present study showed reduction of the activity of catalase in the liver of silver catfish in all periods of exposure to herbicide. This decrease of catalase activity can be coupled to TBARS levels elevated observed. These results are in agreement with Sayeed et al. (2003), that demonstrated a decrease of 45% in hepatic catalase activity and high levels of LPO in freshwater fish (*Channa punctatus*) exposed to deltamethrin insecticide. According to Zhang et al. (2003), a severe oxidative stress can suppress the activities of antioxidant defense enzymes due to oxidative damage and a loss in compensatory mechanisms. In our study, this antioxidant response of fish *Rhamdia quelen* (decrease of catalase activity), was not irreversible, as observed by capacity to recover the activity to normal values after 96 h in water free of herbicide.

Histological studies of the hepatic tissue confirm damage induced by pollutants. Histology analysis was studied to determinate if

occur cellular changes in liver, considered the major target organ of detoxification. We observed hepatocyte vacuolation after 192 h of exposure at 1.0 mg/L clomazone. Fish transferred to water without clomazone presented vacuolation at both concentrations, suggesting that a long exposure cause damage to hepatic tissue. Poleksić & Karan (1999) observed hepatocyte vacuolation and necrosis in *C. carpio* exposed to trifluralin herbicide and recommend both biochemical and histological studies in the measure of nonlethal effects of pesticides in fish.

Values of control groups did not presented significant difference among exposure periods, indicating good experimental conditions.

The present work showed that clomazone concentrations used in rice fields can cause changes in metabolic state of the fish. It was confirmed by histology analysis of the liver. Changes observed in this study were of moderate intensity and reversible. However, although reversible, the changes found could affect fish health, making them more sensitive to environmental changes. More studies are needed to use the fish *Rhamdia quelen* associated in fish-rice fields with clomazone herbicide.

References

- Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S (2000) Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Bioch Biophys Acta* 1523: 37-48.
- Barcellos LJ, Kreutz LC, Quevedo RM, Fioreze I, Cericato L, Soso AB, *et al.*, (2004) Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture* 232: 383-394.
- Boyd CE, Tucker CS (1992) Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, USA, p. 183.
- Bradford MM (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.
- Bretaudt S, Toutant JP, Saglio P (2000) Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 47:117-124.
- Cerón JJ, Ferrando MD, Sancho E, Gutierrez-Panizo C, Andreu-Moliner E (1996) Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of european eel (*Anguilla anguilla*). *Ecotoxicol Environ Saf* 35: 222-225.
- Colby SR, Lym RG, Hill ER, Mc Avoy WJ, Kitchen LM, Prasad R (1989) *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*. 6th ed. Illinois.

- Dembelé K, Haubruge E, Gaspar Ch (1999) Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio*) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. Bull Environ Contam Toxicol 62: 731-742.
- Dutta HM, Arends DA (2003) Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. Environ Res 91: 157-162.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7: 88-95.
- Fernández-Vega C, Sancho E, Ferrando MD, Andreu E (2002) Thiobencarb-induced changes in Acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. Pest Biochem Physiol 72: 55-63.
- Fraga CG, Cavanagh E, Carrasquedo F, Lotito S, Lucesoli F, Oteiza PI (1996) Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon, Manaus, 323-330.
- Hinton DE, Segner H, Braunbeck T (2001) Toxic responses of the liver. In: Daniel, S.; Benson, W.H. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. London, 1: 225 – 266.
- Janero D (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radical Biol Med 9: 515-540.
- Jonsson CM, Maia AHN, Ferreira CJA, Ribeiro EO (1998) Risk assessment of the herbicide clomazone in the aquatic life. Verh Internat Verein Limnol, Stuttgart. 26: 1724-1726.

- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Pascariello M, Marinosci L, Schettino T (2003) Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar Pollut Bull* 46: 324-330.
- Li W, Yin D, Zhou Y, Hu S, Wang L (2003) 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 56:251-255.
- Miron DS, Silva LVF, Golombieski JI *et al.* (2004) Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Ciênc Rural* 34.
- Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalphy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Anal Biochem* 49: 474-478.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
- Poleksíc V, Karan V, (1999) Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. *Ecotoxicol Environ Saf* 43: 213-221.
- Rodrigues, NR, Almeida, FS, (1998) **Guia de Herbicidas**, 4.ed. Londrina, PR, Brasil, pp.137-142.
- Sancho E, Fernandez-Vega C, Sanchez M, Ferrando MD, Andreu-Moliner E (2000) Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. *Ecotoxicol Environ Saf* 46: 57-63.

- Sancho E, Ferrando MD, Andreu E (1997) Response and recovery of acetylcholinesterase activity in the european eel *Anguilla anguilla* exposed to fenitrothion. J Environ Sci Health B 32 (6): 915-928.
- Sayeed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Rizwanul H, Raisuddin S (2003) Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicol Environ Saf 56: 295-301.
- Schlenk D, Wolford L, Chelius M, Steevens J, Chan KM (1997) Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. Comp Biochem Physiol C 118(2): 177-183.
- Sevgiler Y, Oruç EÖ, Üner N (2004) Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. Pest Biochem Physiol 78: 1-8.
- Villescas R, Oswald R, Marimoto H (1981) Effects of neonatal undernutrition and cold stress on behavior and biochemical brain parameters in rats. J Nutr 111: 1103-1110.
- Zanella R, Primel EG, Machado SLO, Gonçalves FF, Marchezan E (2002) Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. Chrom 55: 573-577.
- Zhang J, Shen H, Wang X, Wu J, Xue Y (2003) Effects of chronic exposure of 2,4-dichlophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. Chemosphere 55:167-174.

3.2 Artigo 2

Effects of Clomazone Herbicide on Some Parameters of Protein and Carbohydrate Metabolism of Silver Catfish (*Rhamdia quelen*)

Márcia Crestani, Charlene Menezes, Lissandra Gluszczak, Rafael Lazzari, Marta F. Duarte, Denise dos Santos Miron, Vera Maria Morsch, Vânia Pimentel Vieira

Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

(artigo em fase de preparação para ser submetido à publicação na revista Aquaculture Research)

Author for correspondence:

Vania Lucia Pimentel Vieira

Department of Chemistry

Federal University of Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil

Phone: 55 –220-8053

E-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

The effects of clomazone herbicide (0.5 and 1.0 mg/L) on certain metabolites and enzymes of protein and carbohydrate metabolism were evaluated in silver catfish *Rhamdia quelen* after 12, 24, 48, 96 and 192 hours of exposure and following cessation of exposure for 96 and 192 hours. Liver glycogen levels enhanced during herbicide exposure, reaching the maximum of 250% after 12 h, while the muscle presented reduce in these levels (18% to 40%). It was observed elevated plasma glucose values after all periods of exposure. Lactate content increased significantly in the muscle (22% to 67%) and plasma (23% to 118%), but reduced in the liver. Protein levels were enhanced in the liver (165%; 48 h) and white muscle (about 20%), except at last periods of exposure, while plasma protein increased from 48 to 96 h of exposure to the herbicide, reaching the maximum increase of 65% after 48 h. It was observed reduced protein levels in muscle tissue and plasma after 192 and 24 h, respectively. Aminotransferases (ALT; AST) activities were elevated in the plasma, reaching increase >100% after 24 and 48 h, while in the liver, ALT increased in the early periods only. Liver AST activity was enhanced after 12 h of exposure, and after 24 h its activity reduced significantly. Hematocrit contents were reduced after 96 and 192 h of exposure to clomazone and hemoglobin did not change in exposed fish. Most of the metabolic disorders did not persist after recovery period, except to liver AST and ALT activities. Our results evidence clomazone effect on fish energy metabolism.

Key Words: clomazone, herbicide, protein, carbohydrate, aminotransferases, silver catfish, recovery

Introduction

The aquatic environment is continuously being contaminated with chemicals from agriculture activities. Several pesticides of different chemical structure are extensively used to control a wide variety of agricultural pests and can contaminate aquatic habitats due to leaching and runoff water from treated areas. The pesticides may produce an immense disruption of the ecological balance causing damage to nontarget organisms including fish of commercial importance (Oruç & Üner, 1999; Bretaud et al., 2000).

Different biochemical and physiological responses occur when a toxicant enters an organism, which may be adaptive or may indicate toxicity (Begum, 2004). The blood of fish is sensitive to pollution-induced stress and changes on the hematological parameters, such hemoglobin content, hematocrit and also lactate, glucose and total protein levels in the plasma can be used as toxicity indicators of the environmental contaminants (Roche and Bogé, 2000; Sancho et al., 2000). Liver is the metabolic centre for detoxification of organism. Liver damage can be identify by alterations in the activities of enzymes how aspartate aminotransferase (AST; EC 2.6.1.1) and alanine aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) (Oruç and Üner, 1999; Poleksic and Karan, 1999).

The clomazone herbicide (2-(2-chlorophenyl)methyl-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone) is widely used against weed in paddy rice fields at Southern Brazil (Jonsson et. al., 1998). Clomazone residues

can last for up to 130 days in agricultural water and were detected in 90% of water samples collected from rivers of the rice cultivation regions (Zanella et al., 2002). It is a herbicide highly effective, but may cause groundwater contamination due to their water solubility (1100 mg L⁻¹) and long half-life dissipation averaging from 28 to 84 days (Colby et al., 1989). A great number of workers have investigated the toxicity and biochemical effects of different herbicides and pesticides on several species of fishes (Jyothi and Narayan, 1999; Sancho et al., 2000; Das and Mukherjee, 2003; Begum, 2004).

The effect of clomazone on fish species is scarcely studied. Particularly in silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), there are little reports on biochemical response of exposure to clomazone. This is a native species that support cold winters and grows fast in summer, reaching 600 – 800 g of body weight in 8 months (Barcellos et al., 2004). It is a commercial relevant species in fisheries of South Brazil because it shows good productivity and high consumer potential (Radünz Neto, 1981). However, more studies are necessary for silver catfish, *Rhamdia quelen*, to be used associated in fish-rice fields where herbicides are common.

Then the aim of this study was to detect effects of clomazone exposure in *Rhamdia quelen* (silver catfish), in the concentrations used in rice fields, through measurement of biochemical and hematological parameters as possible toxicity indicators.

Material and methods

Fish

Juvenile *Rhamdia quelen* of both sexes with average weight of 45.0 ± 8.0 g and 17 ± 1.0 cm length, acquire from the university fish farm (UFSM), were acclimated to laboratory conditions for 10 days, in 250 L boxes, with aerated water and natural photoperiod (12 h light-12 h dark). Water conditions were: temperature $21 \pm 1.0^\circ\text{C}$, pH 7.6 ± 0.2 units, dissolved oxygen 6.4 ± 0.3 mg/L, non-ionized ammonia 0.007 ± 0.001 mg/L, nitrite 0.03 ± 0.01 mg/L, alkalinity 65 ± 5.4 mg/L CaCO_3 and hardness 20 ± 1.5 mg/L CaCO_3 . All water parameters were determined according to Boyd and Tucker (1992). During acclimatizing, fish were fed one a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). During experimental period fish were feeding each other 48 h. Sewage and pellet leavings were every other day removed by suction.

Experimental design

The herbicide used in this study was of commercial source (Gamit - 36% purity) obtained from FMC Corporation (Philadelphia, EUA). Previous experiments carried out in our laboratory established 7.32 mg/L as the LC_{50} 96 h for clomazone (Miron et al., 2004). The concentration usually recommended in rice fields is of 0.4 to 0.7 mg/L of water (Rodrigues and Almeida, 1998) and thus it was choosed

clomazone concentrations of 0.5 and 1.0 mg/L for experiments. After acclimation period, 45L glass boxes were stocked up with 6 fish per box. Stock solutions were prepared by dissolving clomazone in water. This solution was added into the experimental boxes. Two control boxes were filled with clean water for each experimental period and 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone were added to two series of ten boxes (duplicate). Fish were exposed at 12, 24, 48, 96 and 192 h to clomazone. Herbicide concentration was monitored every two days by high-performance liquid chromatography (HPLC) method to verify clomazone values in experimental box. Herbicide concentration in the water after 48 h was approximately 90% of the initial concentration (data not showed). The water in the boxes was renewed every 48 h to maintain the concentration of clomazone constant during the period of exposure. Water quality characters during the treatment period were the same of acclimation period.

Sampling

After experimental period, fish were collected of each duplicate box and blood was collected from caudal vein into syringes with traces of heparin for determinate blood and plasma parameters. Fishes were killed by punching of spinal cord behind opercula. White muscle and liver samples were rapidly removed, washed in 150 mM saline solution, packed in Teflon tubes and kept at -4°C for analyses of transaminases activities, glycogen, lactate and protein levels. Two series (duplicate) of four extras boxes with 6 fishes per box were used

to recovery periods as follow. After exposure to both clomazone concentrations, fishes were kept in water without herbicide for 96 and 192 h to recovery periods (after 96 and 192 h of exposure, respectively). Fishes were sampled at the end of recovery experiments and blood and liver samples were collected for analyses of AST (EC 2.6.1.1), ALT (EC 2.6.1.2) activities and parameters of plasma and blood. Fish control boxes were sampled at the each experimental period.

Analytical procedures

Part of the blood collected was used for hemoglobin and hematocrit determinations. Hemoglobin contents (Hb) were determined spectrophotometrically (500 nm) using the cyanomethemoglobin method. Hematocrit was determined using Pentra 120 automatized reading based in the height of a pulse generated by cell passage. The rest of blood was centrifuged at 3000 x g for 10 min and plasma was separated. Plasma AST and ALT activities were determined using dry quimic method (Bergmeyer et al., 1986a,b). These tests were carried out in a clinical laboratory (LABIMED- Santa Maria- RS). Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method with Bioclin test kit. Plasma was dissolved in trichloroacetic acid 10% (1:20 dilution) and lactate was estimated according to Harrower & Brown (1972). Plasma total protein levels were measured according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (Sigma) as standard.

Liver and muscle glycogen was determined according to Bidinotto et al. (1998) after KOH and ethanol addition for hydrolysis and precipitation of glycogen. For protein analysis, the tissues were cooled at 100°C with KOH and centrifuged at 1000 x g for 10 min. Supernatant was used to estimate the total protein level according to Lowry et al. (1951). For lactate determination, tissues samples were homogenized by adding trichloroacetic acid 10% (1:20 dilution) using a motor-driven Teflon pestle and centrifuged at 1000 x g for 10 min for flocculation of the proteins. The supernatant completely deproteinated was used for lactate determination by Harrower & Brown (1972) method and glucose measured according to Dubois et al. (1956).

To measure hepatic transaminases (AST and ALT), liver samples were homogenized in 0.02M potassium phosphate buffer, pH 7.5, at 4°C (5% w/v), using a motor-driven Teflon pestle. AST and ALT activities were estimated according to Reitman and Frankel (1957). The reaction mixture contained 11.6 mM of α -ketoglutarate, AST and ALT specific substrates (44.4 mM L-aspartic acid and 222 mM DL-alanine, respectively), 0.277 mM piridoxal, 0.22 mM arsenate in 53.3 mM phosphate buffer (pH 7.5). The reaction was started by adding aliquots of the homogenate (30 μ L). After 30 min of incubation, the reaction was stopped adding 2,4-dinitrophenylhydrazine and the mixture was centrifuged at 5000 x g for 3 min. Aliquots were retired and was added 3 mL of 1.3 M sodium hydroxide. The product was evaluated spectrophotometrically at 440 nm.

Chemicals used were of the highest analytical grade and measurements were done in triplicate.

Statistical procedures

Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) to determine concentration and time effects. Means were compared by Tukey test and were expressed as mean \pm standard deviation. A *P* value < 0.05 was considered to be significant.

Results

As seen in Table 1, liver glycogen concentration enhanced significantly in all periods and concentrations tested, with the maximum increase (250%) after 12 h of exposure. A significant reduction in hepatic lactate levels was observed in liver after 12, 24 and 96 hours of exposure. Fish exhibited increased protein levels in this tissue in both herbicide concentrations in the early periods of exposure, reaching increase of 165% after 48 h, and returned to control values after 96 h of exposure.

Muscle tissue showed different clomazone-induced responses (Table 2) as compared to liver. Glycogen levels decreased from 24 hours exposure at 0.5 and 1.0 mg/L herbicide concentrations (31% and 35%, respectively). This reduction persisted until 96 h exposure, and glycogen increased at the last exposure period at both herbicide concentrations. Muscle lactate levels increased after 12, 24 and 48 hours (22% to 67%) of clomazone exposure; however this increase did not occur in both herbicide concentrations. After 192 h of exposure, fish presented a fall (28%) in lactate levels at 1.0 mg/L clomazone. Clomazone caused elevation (about 20%) in protein levels in muscle, being significant from 24 to 96 hours exposure to herbicide. At the last exposure period, fish exposed to 1.0 mg/L of clomazone, showed protein reduction (20%) (Table 2).

Changes in hematological parameters are indicated in Table 3. We also determined the influence of recovery in these parameters when a recovery period in clean water was allowed (Table 4). It was

observed increase in glucose (35% to 81%) and lactate levels (23% to 118%) in treated fish in all periods of clomazone exposure. Recovery of these levels to control values occurred after 96 h and 192 h in water without herbicide, for glucose and lactate, respectively (Table 4). Plasma protein content decreased after 24 h of clomazone exposure (27% at 1.0 mg/L), but an increase in these levels was demonstrated at 48 and 96 h of exposure, reaching maximum increase of 65% after 48 h (1.0 mg/L) (Table 3). On the other hand, at 192 h exposure, protein levels showed recuperation, as observed also in the recovery period (Table 4). No significant changes were observed in the levels of hemoglobin. Hematocrit values were decreased after 96 h (22% at 0.5 mg/L) and 192 h (29% at 0.5 mg/L and 36% at 1.0 mg/L) of exposure (Table 3). Animals transferred to water free of clomazone showed recovery of these parameters compared with control values (Table 4).

Plasma ALT activity (Figure 1A) markedly increased in all periods of exposure at both herbicide concentrations, with the maximum increase (170%) after 24 h of exposure at 1.0 mg/L of clomazone. A statistically significant increase was also observed in the AST activity in all exposure periods (30% to 100%), although it did not occur at both concentrations (Figure 1B). These increases did not persist during the recovery periods in water without clomazone. Liver ALT activity (Figure 2A) enhanced after 12 h of exposure at 0.5 mg/L (90%) and 1.0 mg/L (62%) of herbicide and after 24 h at 0.5 mg/L (30%). In the next periods, the animals did not show significant changes in ALT activity. However, during the recovery period, ALT activity enhanced again, reaching increase of 117% after 96 h in clean

water. Activity of liver AST (Figure 2B) increased (30%) at first time of exposure to both clomazone concentrations and decreased after 24 h (18% - 1.0 mg/L), 48 h (18% - 0.5 mg/L) and 96 h (35% - 0.5 mg/L; 22% - 1.0 mg/L) of exposure. Animals transferred to water free of herbicide showed increase of AST activity after both recovery periods (78%; 96 h; 0.5 mg/L and 25%; 192 h; 1.0 mg/L).

Control values did not presented significant difference among exposure periods.

Table 1. Biochemical changes in liver tissue of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 hours

Groups	Exposure period (hours)				
	12	24	48	96	192
Glycogen ($\mu\text{mol/g}$ tissue)					
Control	72.54 \pm 8.69 ^{Aa}	76.18 \pm 10.69 ^{Aa}	69.94 \pm 7.24 ^{Aa}	77.40 \pm 6.29 ^{Aa}	78.54 \pm 10.4 ^{Aa}
0.5 mg/L	251.72 \pm 30.8 ^{Ba}	90.79 \pm 5.69 ^{Ad}	145.86 \pm 28.4 ^{Bbc}	116.1 \pm 17.1 ^{Bc}	186.2 \pm 27.8 ^{Bb}
1.0 mg/L	256.10 \pm 22.7 ^{Ba}	156.0 \pm 26.27 ^{Bb}	183.30 \pm 20.9 ^{Bb}	156.6 \pm 20.5 ^{Cb}	191.5 \pm 22.2 ^{Bb}
Lactate ($\mu\text{mol/g}$ tissue)					
Control	8.03 \pm 0.62 ^{Aa}	8.10 \pm 0.49 ^{Aa}	7.58 \pm 0.73 ^{Aa}	7.71 \pm 0.73 ^{Aa}	7.98 \pm 0.87 ^{Aa}
0.5 mg/L	7.21 \pm 0.19 ^{Ba}	3.23 \pm 0.52 ^{Cc}	7.65 \pm 1.27 ^{Aa}	5.63 \pm 0.61 ^{Bb}	8.16 \pm 0.95 ^{Aa}
1.0 mg/L	6.66 \pm 0.35 ^{Bab}	5.96 \pm 0.44 ^{Bb}	7.66 \pm 1.14 ^{Aa}	7.24 \pm 0.60 ^{Aa}	7.75 \pm 1.13 ^{Aa}
Protein (mg/g tissue)					
Control	83.30 \pm 7.33 ^{Aa}	83.52 \pm 9.07 ^{Aa}	90.95 \pm 7.33 ^{Aa}	90.71 \pm 6.12 ^{Aa}	85.07 \pm 5.53 ^{Aa}
0.5 mg/L	96.47 \pm 2.00 ^{Bb}	107.10 \pm 12.9 ^{Bb}	134.30 \pm 8.78 ^{Ba}	94.81 \pm 6.17 ^{Ab}	83.85 \pm 11.1 ^{Ab}
1.0 mg/L	112.95 \pm 4.99 ^{Bb}	108.80 \pm 11.1 ^{Bb}	150.87 \pm 12.3 ^{Ba}	97.9 \pm 6.17 ^{Ab}	77.51 \pm 7.10 ^{Ac}

Values are means \pm SD (n=12). Different majuscule letters indicate significant difference among exposure concentrations (column) and different minuscule letters indicate difference among exposure periods (line) (P < 0.05).

Table 2. Biochemical changes in muscle tissue of silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 hours

Groups	Exposure period (hours)				
	12	24	48	96	192
Glycogen ($\mu\text{mol/g}$ tissue)					
Control	11.92 \pm 0.90 ^{Aa}	12.84 \pm 0.72 ^{Aa}	12.14 \pm 1.45 ^{Aa}	12.87 \pm 0.40 ^{Aa}	11.50 \pm 0.97 ^{Aa}
0.5 mg/L	12.38 \pm 1.17 ^{Ab}	8.88 \pm 1.05 ^{Bc}	7.23 \pm 1.37 ^{Bc}	9.65 \pm 1.15 ^{Bc}	17.34 \pm 0.95 ^{Ba}
1.0 mg/L	13.01 \pm 1.18 ^{Ab}	8.65 \pm 0.98 ^{Bc}	8.71 \pm 0.74 ^{Bc}	10.36 \pm 0.99 ^{Bc}	15.99 \pm 1.47 ^{Ba}
Lactate ($\mu\text{mol/g}$ tissue)					
Control	5.38 \pm 0.83 ^{Aa}	6.00 \pm 0.29 ^{Aa}	5.89 \pm 0.22 ^{Aa}	5.51 \pm 0.48 ^{Aa}	4.90 \pm 0.62 ^{Aa}
0.5 mg/L	8.98 \pm 0.65 ^{Ca}	6.73 \pm 0.19 ^{ABb}	9.17 \pm 0.19 ^{Ba}	5.25 \pm 0.77 ^{Ac}	4.25 \pm 0.15 ^{ABd}
1.0 mg/L	7.27 \pm 0.43 ^{Ba}	7.33 \pm 0.82 ^{Ba}	6.14 \pm 0.22 ^{Ab}	5.54 \pm 0.67 ^{Ab}	3.53 \pm 0.60 ^{Bc}
Protein (mg/g tissue)					
Control	63.32 \pm 4.35 ^{Aa}	65.25 \pm 3.09 ^{Aa}	67.25 \pm 5.31 ^{Aa}	64.77 \pm 2.18 ^{Aa}	58.75 \pm 4.07 ^{Aa}
0.5 mg/L	68.10 \pm 3.40 ^{Ab}	79.09 \pm 3.26 ^{Ba}	75.86 \pm 5.45 ^{Bab}	68.85 \pm 5.00 ^{Ab}	54.42 \pm 5.37 ^{Ac}
1.0 mg/L	64.60 \pm 2.44 ^{Ab}	67.16 \pm 6.31 ^{Aab}	66.19 \pm 8.95 ^{Aab}	77.39 \pm 5.07 ^{Ba}	46.85 \pm 4.70 ^{Bc}

Values are means \pm SD (n=12). Different majuscule letters indicate significant difference among exposure concentrations (column) and different minuscule letters indicate difference among exposure periods (line) ($P < 0.05$).

Table 3. Changes in metabolic and hematological parameters: glucose (mg/dL), protein (mg/mL), lactate ($\mu\text{mol/mL}$), hematocrit (%) and hemoglobin (g/dL) in silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L of clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 hours

Groups	Exposure period (hours)				
	12	24	48	96	192
Glucose					
Control	40.54 \pm 5.68 ^{Aa}	34.03 \pm 3.92 ^{Aa}	34.03 \pm 3.84 ^{Aa}	42.80 \pm 3.51 ^{Aa}	36.36 \pm 3.88 ^{Aa}
0.5 mg/L	73.12 \pm 7.22 ^{Ba}	69.82 \pm 4.05 ^{Bab}	45.78 \pm 3.96 ^{Bc}	77.57 \pm 8.05 ^{Ba}	58.03 \pm 8.87 ^{Bbc}
1.0 mg/L	73.36 \pm 6.83 ^{Ba}	47.19 \pm 4.40 ^{Ac}	49.51 \pm 5.92 ^{Bb}	57.28 \pm 4.28 ^{Bb}	51.81 \pm 9.52 ^{Bb}
Protein					
Control	38.62 \pm 2.97 ^{Aa}	42.54 \pm 4.12 ^{Aa}	41.17 \pm 2.52 ^{Aa}	35.82 \pm 3.70 ^{Aa}	38.89 \pm 1.73 ^{Aa}
0.5 mg/L	43.33 \pm 5.87 ^{Ab}	37.15 \pm 4.82 ^{Ab}	64.32 \pm 8.22 ^{Ba}	43.17 \pm 4.65 ^{Bb}	36.51 \pm 2.70 ^{Ab}
1.0 mg/L	41.65 \pm 4.71 ^{Ab}	31.26 \pm 7.19 ^{Bb}	67.90 \pm 9.41 ^{Ba}	40.80 \pm 2.52 ^{Ab}	39.03 \pm 1.26 ^{Ab}
Lactate					
Control	1.00 \pm 0.17 ^{Aa}	1.00 \pm 0.14 ^{Aa}	0.99 \pm 0.13 ^{Aa}	1.00 \pm 0.10 ^{Aa}	1.25 \pm 0.09 ^{Aa}
0.5 mg/L	1.23 \pm 0.19 ^{Bc}	2.18 \pm 0.37 ^{Ba}	1.60 \pm 0.18 ^{Bc}	1.93 \pm 0.15 ^{Bab}	1.74 \pm 0.19 ^{Bbc}
1.0 mg/L	1.13 \pm 0.11 ^{Ab}	1.39 \pm 0.11 ^{Ba}	1.33 \pm 0.17 ^{Bab}	1.65 \pm 0.23 ^{Ba}	1.46 \pm 0.19 ^{Aa}
Hematocrit					
Control	24.73 \pm 3.90 ^{Aa}	23.35 \pm 3.03 ^{Aa}	26.41 \pm 4.82 ^{Aa}	21.96 \pm 1.44 ^{Aa}	21.30 \pm 1.78 ^{Aa}
0.5 mg/L	26.34 \pm 1.41 ^{Aa}	24.08 \pm 4.39 ^{Aa}	29.54 \pm 2.03 ^{Aa}	17.14 \pm 2.40 ^{Bb}	15.15 \pm 2.23 ^{Bb}
1.0 mg/L	26.42 \pm 3.36 ^{Aa}	25.23 \pm 2.65 ^{Aa}	26.84 \pm 5.73 ^{Aa}	23.30 \pm 2.84 ^{Aa}	13.55 \pm 1.94 ^{Bb}
Hemoglobin					
Control	8.00 \pm 1.05 ^{Aa}	8.11 \pm 0.82 ^{Aa}	8.65 \pm 1.56 ^{Aa}	6.96 \pm 0.76 ^{Aa}	6.85 \pm 0.61 ^{Aa}
0.5 mg/L	8.16 \pm 0.54 ^{Aab}	7.76 \pm 1.11 ^{Aab}	9.58 \pm 0.85 ^{Aab}	6.91 \pm 1.81 ^{Ab}	5.45 \pm 1.06 ^{Ab}
1.0 mg/L	8.98 \pm 1.22 ^{Aab}	7.36 \pm 0.68 ^{Aab}	9.20 \pm 1.54 ^{Aab}	7.33 \pm 0.53 ^{Ab}	7.00 \pm 1.14 ^{Ab}

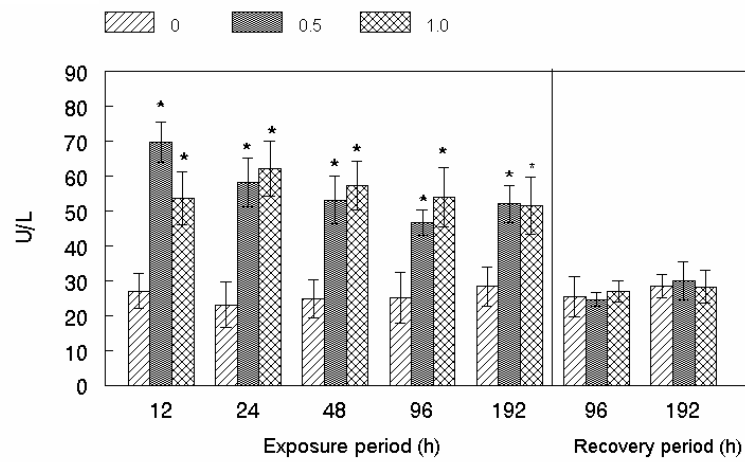
Values are means \pm SD (n=12). Different majuscule letters indicate significant difference among exposure concentrations (column) and different minuscule letters indicate difference among exposure periods (line) (P< 0.05).

Table 4. Changes in metabolic and hematological parameters: glucose (mg/dL), protein (mg/mL), lactate ($\mu\text{mol/mL}$), hematocrit (%) and hemoglobin (g/dL) in silver catfish *Rhamdia quelen* after recovery periods of 96 and 192 hours

Plasma Parameters					
Recovery period	Glucose (mg/dL)	Protein (mg/mL)	Lactate ($\mu\text{mol/mL}$)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dL)
96 hours					
Control	42.80 \pm 3.51 ^A	35.82 \pm 3.70 ^A	1.00 \pm 0.10 ^A	21.96 \pm 1.44 ^A	7.88 \pm 0.71 ^A
0.5 mg/L	40.49 \pm 2.73 ^A	31.57 \pm 3.50 ^A	2.02 \pm 0.63 ^B	21.70 \pm 1.03 ^A	7.60 \pm 1.07 ^A
1.0 mg/L	38.67 \pm 5.90 ^A	38.43 \pm 2.96 ^A	2.88 \pm 0.58 ^B	24.83 \pm 1.87 ^A	7.63 \pm 1.19 ^A
192 hours					
Control	32.63 \pm 4.05 ^A	39.13 \pm 3.67 ^A	1.09 \pm 0.09 ^A	22.15 \pm 1.23 ^{AB}	7.05 \pm 0.63 ^A
0.5 mg/L	37.68 \pm 6.00 ^A	34.98 \pm 2.91 ^A	1.19 \pm 0.16 ^A	20.34 \pm 1.85 ^A	6.16 \pm 0.70 ^A
1.0 mg/L	35.62 \pm 3.67 ^A	42.61 \pm 2.22 ^A	1.07 \pm 0.20 ^A	25.00 \pm 1.91 ^B	7.31 \pm 0.95 ^A

Recovery periods were evaluated after 96 and 192 h, respectively, of clomazone exposure. Values are means \pm SD (n=12). Different letters in column show significant differences among experimental concentrations (P< 0.05).

A)



B)

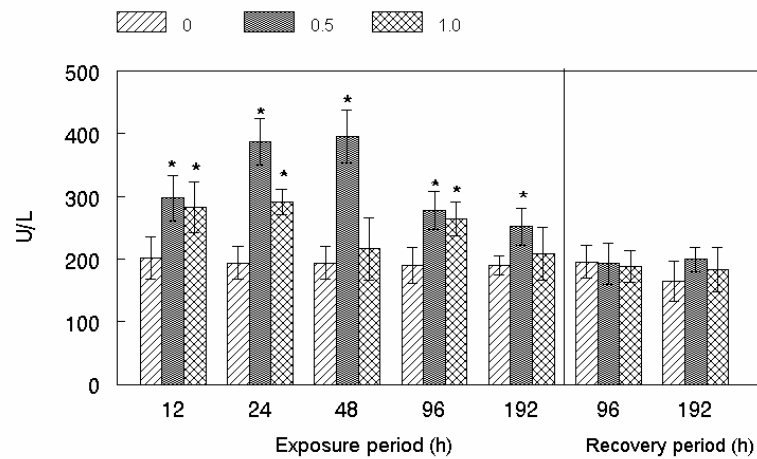
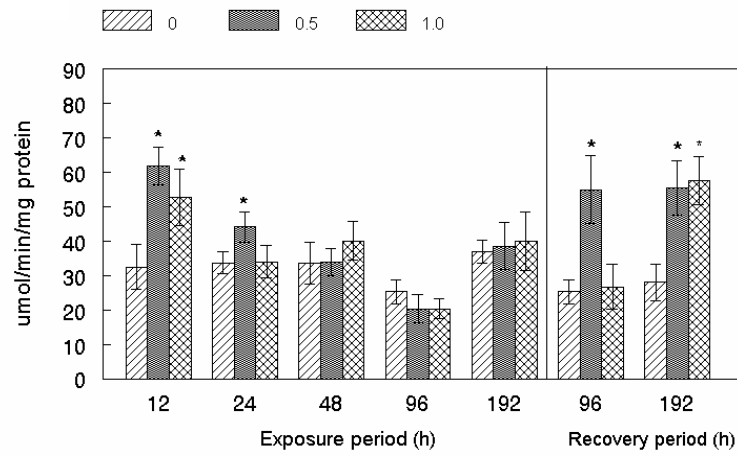


Figure1. Alterations in ALT (A) and AST (B) activities in plasma of *Rhamdia quelen* during exposure to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 h and recovery response after periods of 96 and 192 h in clean water. Data are reported as mean \pm SD (n=12). * indicate significant difference from control (P< 0.05).

A)



B)

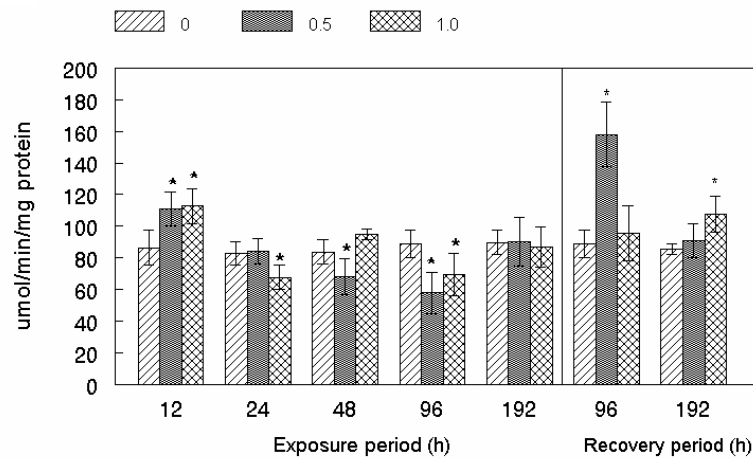


Figure 2. Alterations in ALT (A) and AST (B) activities in the liver of *Rhamdia quelen* during exposure to 0.0, 0.5 and 1.0 mg/L clomazone during 12, 24, 48, 96 and 192 h and recovery response after periods of 96 and 192 h in clean water. Data are reported as mean \pm SD (n=12). * indicate significant difference from control (P< 0.05).

Discussion

Results obtained in this study are clearly suggestive of disrupted carbohydrate and protein metabolism in silver catfish *Rhamdia quelen* exposed to clomazone herbicide on concentrations used in rice fields. Glycogen levels were increased in liver tissue and reduced in muscle tissue. These results can suggest that the fish used muscle glycogen as energy source to compensate stress situation and it is saving hepatic energy for a possible stress more prolonged. Oruç and Üner, (1999) also observed reduced level of muscle glycogen in other freshwater fish, *Cyprinus carpio*, after 3 days of exposure to 2,4-Diamin herbicide.

Rhamdia quelen exposed to clomazone exhibited an increase in plasma glucose levels. However, this hyperglycemia can not be associated to hepatic glycogen stores because did not occur glycogenolysis in this tissue. Fish transferred to water without clomazone exhibited recovery of plasma glucose levels after 96 h of recovery. Other workers also registered recovery in the plasma glucose content of *A. anguilla* exposed to fenitrothion after 96 h in clean water (Sancho et al., 1998).

The result of this study indicated that fish favored anaerobic respiration to meet energy demands when aerobic oxidation was reduced. Lactate levels were reduced in the liver and elevated in the muscle and plasma of fish after clomazone exposure. It can be occurring glyconeogenesis in hepatic tissue, transforming lactate in glucose that will be liberated in plasma, increasing its levels. Lactate

as a measure of anaerobic metabolism has been widely used. It is the end product of glycolysis under hypoxic conditions. According to Begum and Vijayaraghavan, (1999), increases of lactic acid contents indicate metabolic disorders and can suggest a severe respiratory stress in the fish tissue. Endosulfan also induced muscle glycogenolysis and a marked rise in blood lactate in *A. anguilla* (Gimeno et al., 1995). Lactate levels in the plasma were reduced to control values after 192 h in water free of clomazone.

Protein levels were reduced in the plasma of *Rhamdia quelen* after 24 h and in muscle after 192 h, both after exposure to 1.0 mg/L of clomazone. According to Sancho et al., (1998), reduction in protein content indicates physiological adaptability of the fish to overcome stress situation. Stress animals use protein catabolism to supply high energy demand required in this situation. In our work, after this initial fall in plasma protein levels, it was observed a significant rise after 48 and 96 h of herbicide exposure. Hyperproteinemia was also observed in the liver in the early periods of exposure and from 24 h in the muscle. Fish exposed to pesticide may compensate any possible protein loss by increasing its protein synthesis (Sahib et al., 1984). We can suggest that fish can be increasing its protein synthesis preventing a situation of necessity of use protein catabolism who energy source.

Hematological parameters such as hematocrit and hemoglobin content can also be considered indicators of toxicity in fish studies (Sancho et al., 2000). In the present work, the content of these parameters of control group was similar to level found by Tavares-Dias et al., (2002), suggesting acceptable culture conditions during the

treatments. Decrease in hemoglobin and hematocrit levels can indicate an anemic condition (Kumar et al., 1999). Clomazone induced reduction in the hematocrit value of *Rhamdia quelen* after 96 h and 192 h, indicating a possible anemic state. However, this condition was easily overcome after recovery periods. Hemoglobin did not change significantly. This shows that the oxygen carrying capacity of fish has not been affected by clomazone.

Liver is the metabolic centre for detoxification of organism. Liver damage can be identified by alterations in the activities of enzymes such as aminotransferases AST and ALT (Oruç and Üner, 1999; Poleksic and Karan, 1999). Injuries caused in liver cells may result on leakage of enzymes into serum. In this study, *Rhamdia quelen* exposed to clomazone showed increased AST and ALT activities significantly in the plasma in all periods of exposure. This elevation did not persist when the fish were transferred to water without herbicide. This fact can show that hepatic disorders are transient. Liver ALT activity initially enhanced after 12 and 24 h of exposure, but it was at the control level from 48 h to 192 h of exposure at both concentrations of clomazone. AST activity in the liver increased significantly in the first period of exposure, it reduced from 24 h and did not presented significant changes in the last time (192 h) of exposure. During the recovery periods, ALT and AST activities increased again, showing that tissue damages can occur even after to stop exposure to herbicide. This was observed also in other work, where we observed hepatocyte vacuolation in *Rhamdia quelen* during recovery period in clean water, after exposure to 1.0 mg/L of

clomazone herbicide for 192 h (date not publicated). Changes of transaminases that suggested tissue damage are reported in fish exposed to xenobiotics (Oruç and Üner, 1999; Poleksic and Karan, 1999; Aguiar et al., 2001; Begum, 2004). Poleksic and Karan, (1999) suggested that hepatocyte necrosis can be caused by increase in AST activity in liver and serum of fish. Biochemical properties of fish liver are poorly understood. It is not possible to say certainly that serum enzyme alterations are due solely to hepatic responses and not to toxic injury in cells of other organs and tissues as well (Hinton *et al.*, 2001).

Control values did not presented significant difference among exposure periods, indicating good experimental conditions.

Conclusions

The results of the present study show that the protein and carbohydrate metabolism is disrupted in silver catfish *Rhamdia quelen* on exposure to clomazone herbicide. Judging from the changes in tissue and plasma levels of various metabolites, a preference for the anaerobic pathway of energy production is indicated in muscle tissue. Most of the metabolic disorders did not persist after allowing recovery in water without clomazone. However, more studies are needed to use the fish *Rhamdia quelen* associated in fish-rice fields with clomazone herbicide.

References

- Aguiar, L.H.; Corrêa, C.F.; Moraes, G. 2001. Efeitos do pesticida organofosforado methyl parathion (Folidol 600[®]) sobre o metabolismo e atividade de colinesterases do teleósteo de água doce, *Brycon cephalus* (Matrinxã) (Günther, 1869). In: Ecotoxicologia, Perspectivas para o Século XXI. São Carlos, SP, pp. 269-279.
- Barcellos, L.J.; Kreutz, L.C.; Quevedo, R.M.; Fioreze, I.; Cericato, L.; Soso, A.B. *et al.* 2004. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquac.* 232, 383-394.
- 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.
- Begum, G.; Vijayaraghavan, S. 1999. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environ. Res. A* 80, 80-83.
- Bergmeyer, H.U.; Horder, M.; Rej, R. 1986a. Approved Recommendation (1985) on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic concentration of Enzymes. Part 2. IFCC Method for Aspartate Aminotransferase (L-Aspartate: 2-Oxoglutarate Aminotransferase, EC 2.6.1.1). *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 24, 497-571.
- Bergmeyer, H.U.; Horder, M.; Rej, R. 1986b. Approved Recommendation (1985) on IFCC Methods for the Measurement

- of Catalytic concentration of Enzymes. Part 3. IFCC Method for Alanine Aminotransferase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 24, 481.
- Bidinotto, P.M.; Moraes, G.; Souza, R.H.S. 1998. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico 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.
- 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.
- 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 América. 6th ed. Illinois, 65-66.
- Das, B.K.; Mukherjee, S.C. 2003. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comp. Biochem. Physiol.* 134(C), 109-121.
- 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.
- Gimeno, L.; Ferrando, M.D.; Sanchez, S.; Gimeno, L.O.; Andreu, E. 1995. Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 153-157.

- Harrower, J.R.; Brown, C.H. 1972. Blood lactic acid. A micromethod adaptable to field collection of microliter sample. *J. Appl. Physiol.* 32 (5), 224-228.
- Hinton, D.E.; Segner, H.; Braunbeck, T. 2001. Toxic responses of the liver. In: Daniel, S.; Benson, W.H. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. London, 1, 225-266.
- Jonsson, C.M.; Maia, A.H.N.; Ferreira, C.J.A.; Ribeiro, E.O. 1998. Risk assessment of the herbicide clomazone in the aquatic life. *Verh. Internat. Verein. Limnol. Stuttgart*, 26, 1724-1726.
- Jyothi, B.; Narayan, G. 1999. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). *Food Chem. Toxicol.* 37, 417-421.
- Kumar, S.; Lata, S.; Gopal, K. 1999. Deltamethrin induced physiological changes in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Bull. Environ. Toxicol.* 62, 254-258.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Miron, D.S.; Silva, L.V.F.; Golombieski, J.I.; Baldisserotto, B. 2004. Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Ciência Rural*, 34.
- 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.

- Poleksíc, V.; Karan, V. 1999. Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43, 213-221.
- Radünz Neto, J. 1981. Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas de jundiá *Rhamdia quelen*. Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil 77p.
- Reitman, S.; Frankel, F. 1957. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic acid transaminase. *Am. J. Clin. Path.* 28, 56.
- Roche, H.; Bogé, G. 2000. In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.* 125 (C), 345-353.
- Rodrigues, N. R.; Almeida, F. S. 1998. Guia de Herbicidas, 4ª ed., 137-142.
- Sahib, I.K.A.; Sambasiva Rao, K.R.S.; Ramana Rao, K.V. 1984. Effect of malathion on protein synthethic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mostambica* (Peters), as measured through incorporation of (14C) amino acids. *Toxicol. Lett.* 20, 63-67.
- Sancho, E.; Cerón, J.J.; Ferrando, M.D. 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 81-86.
- Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Fernández, C.; Andreu, E. 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 168-175.

Zanella, R.; Primel, E.G.; Machado, S.L.O.; Gonçalves, F.F.;
Marchezan, E. 2002. Monitoring of the herbicide clomazone in
environmental water samples by solid-phase extraction and high-
performance liquid chromatography with ultraviolet detection.
Chrom. 55, 573-577.

4. DISCUSSÃO

O herbicida clomazone, nas concentrações utilizadas nas lavouras de arroz, induziu alterações significativas nos parâmetros hematológicos, enzimáticos e metabólicos avaliados no peixe jundiá, *Rhamdia quelen*.

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) é amplamente utilizada no estudo da toxicidade provocada por herbicidas e pesticidas em peixes e demais organismos aquáticos (Bretau *et al.*, 2000; Dutta & Arends, 2003; Lionetto *et al.*, 2003). A inibição da atividade dessa enzima foi observada neste trabalho tanto no tecido cerebral, como muscular (Artigo I, Tabela 1). Essa alteração vem sendo observada em trabalhos com diferentes classes de herbicidas e pesticidas (Bretau *et al.* 2000; Sancho *et al.* 2000; Dutta & Arends, 2003). Com a atividade da AChE diminuída, ocorre acúmulo do neurotransmissor acetilcolina dentro das sinapses colinérgicas, o que resultará em declínio do controle neuronal e muscular (Dutta & Arends, 2003).

A inibição da atividade da AChE pode ser reversível, como observamos no presente estudo (Artigo I, Tabela 1). O tempo necessário para recuperação da atividade depende de diversos fatores, como: tipo de pesticida, espécie testada, extensão da depressão da atividade da enzima, concentração do produto e tempo de exposição (Abdullah *et al.*, 1994; Sancho *et al.*, 2000).

Os poluentes aquáticos podem induzir estresse oxidativo mediado por espécies reativas de oxigênio (ROS). Através da ação de

ROS, podem-se observar danos a células e biomoléculas, levando à modificação ou perda de suas funções (Fraga *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 2000). Um possível efeito da ação de ROS é a peroxidação lipídica (formação de TBARS) (Sayeed *et al.* 2003), a qual estava aumentada no tecido hepático de jundiás expostos ao herbicida clomazone (Artigo I, Tabela 2). A peroxidação lipídica (TBARS) tem sido amplamente utilizada como marcador de estresse oxidativo (Li *et al.* 2003; Sayeed *et al.* 2003). No tecido cerebral de jundiás, os níveis de TBARS aumentaram nos primeiros períodos de exposição e apresentaram queda após 96 e 192 horas (Artigo I, Tabela 2). A peroxidação lipídica é pouco estudada no tecido cerebral em peixes. Por isso, torna-se um pouco difícil discutir essa resposta apresentada no presente trabalho. Poderia-se sugerir que a diminuição dos níveis de TBARS estaria ocorrendo através de algum mecanismo compensatório adotado pelo organismo do peixe para superar o estresse oxidativo provocado pelo herbicida.

A medida de enzimas com atividade antioxidante pode ser utilizada para averiguar exposição de organismos aquáticos a poluentes ambientais (Ahmad *et al.* 2000; Lionetto *et al.* 2003). No presente trabalho, o herbicida clomazone induziu diminuição da atividade da enzima antioxidante catalase nos jundiás (Artigo I, Figura 1). O mesmo foi observado por outros autores (Sayeed *et al.*, 2003). Essa resposta pode estar associada aos níveis elevados de TBARS observados no tecido hepático, uma vez que o balanço entre a produção de oxidantes e sua remoção por antioxidantes é quem determina a extensão de peroxidação lipídica no tecido. As alterações

observadas nos níveis de TBARS e atividade da catalase não persistiram após o período de recuperação em água limpa, mostrando que esses efeitos são transitórios e podem ser recuperados após 192 horas em água limpa.

A análise histológica do tecido mostrou vacuolização nos hepatócitos após 192 horas de exposição, o que pode indicar que uma exposição prolongada provoca danos ao tecido hepático (Artigo I, figura 3). Essa alteração persistiu no período de recuperação (Artigo I, figura 4), mostrando que alterações estruturais podem ser observadas mesmo após ter cessado a exposição ao herbicida.

O glicogênio possui grande capacidade de produção de energia. Nos momentos de estresse ambiental, ou que requerem maiores demandas de energia, este metabólito é rapidamente catabolizado, resultando em grandes perdas dessa reserva de energia, com conseqüente aumento na glicose livre disponível (Gimeno *et al.*, 1995; Sancho *et al.*, 1998). Nós observamos uma intensa glicogenólise muscular (Artigo II, Tabela 2), o que sugere que o jundiá utilizou reserva de energia desse tecido para compensar a situação de estresse. Por outro lado, as reservas de glicogênio hepático estavam aumentadas (Artigo II, Tabela 1), o que pode indicar uma preparação do organismo caso o estresse causado pelo herbicida persista. Hiperglicemia plasmática foi visualizada nos jundiás expostos ao clomazone (Artigo II, Tabela 3). O aumento da glicose no plasma, entretanto, não poderá ser atribuído, neste caso, ao glicogênio hepático. Segundo alguns autores, o aumento nos níveis de catecolaminas, após inibição da enzima AChE, observado em animais

expostos a contaminantes, poderia afetar a atividade de enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogênio, bem como na síntese de glicose (Sastry & Siddiqui, 1982).

Ao mesmo tempo em que observamos níveis de glicogênio aumentados no fígado, temos uma queda no conteúdo de lactato nesse tecido (Artigo II, Tabela 1). A redução no lactato hepático pode indicar sua drenagem para síntese de glicose, sendo esta remetida ao plasma. Por outro lado, os níveis de lactato aumentaram no tecido muscular e plasma dos jundiás expostos ao clomazone (Artigo II, Tabelas 1 e 3). O lactato é o produto final da glicólise em condições de pouco oxigênio. O aumento no conteúdo de lactato pode sugerir que o peixe se encontra em uma situação de estresse respiratório (Begum & Vijayaraghavan, 1999), favorecendo a respiração anaeróbica para suprir a demanda energética, uma vez que a oxidação aeróbica está reduzida.

O conteúdo de proteína depende do equilíbrio entre a sua síntese e degradação (Sancho *et al.*, 1998). Animais que se encontram em uma situação de estresse podem, alguma vezes, utilizar a fonte protéica para suprir a alta demanda de energia requerida nessa situação. Em nosso trabalho, os níveis de proteína reduziram no plasma após 24 horas de exposição e aumentaram nos períodos seguintes (Artigo II, Tabela 3). Esse aumento também foi observado no tecido hepático e muscular (Artigo II, Tabelas 1 e 2). O catabolismo das proteínas utilizado para fornecer energia poderia estar aumentando a síntese protéica (Sahib *et al.*, 1984).

A redução do hematócrito e do conteúdo de hemoglobina pode refletir um estado anêmico relacionado à exposição ao herbicida (Sancho *et al.*, 2000). Em nosso estudo, podemos observar que a capacidade de transporte de oxigênio não foi grandemente afetada pelo clomazone, visto que o conteúdo de hemoglobina não apresentou alterações e a redução no valor do hematócrito após 96 e 192 horas de exposição foi normalizada durante o período de recuperação (Artigo II, Tabela 3).

O fígado é considerado o centro metabólico de detoxificação e alterações nas atividades da AST e ALT podem ser utilizadas para detectar um possível dano ao tecido hepático. Ao ocorrer dano tecidual ao fígado, poderá ser observada a liberação dessas enzimas na corrente sanguínea, causando uma atividade aumentada delas no plasma (Oruç & Üner, 1999). No presente trabalho, pôde-se observar aumento na atividade dessas enzimas no plasma (Artigo II, Figura 1) em todos os períodos de exposição e, no fígado, nos períodos iniciais (Artigo II, Figura 2). A atividade retornou a níveis normais no plasma e estava aumentada no fígado durante o período de recuperação. Apesar de inúmeros estudos envolvendo o tecido hepático, suas propriedades bioquímicas em peixes ainda não estão bem compreendidas. Além disso, não podemos afirmar com certeza se alterações observadas em enzimas plasmáticas são devido a respostas hepáticas ou devido a injúrias em outros órgãos e células (Hinton *et al.*, 2001).

O organismo do peixe responde à toxicidade provocada por herbicidas através de alterações fisiológicas que podem ser tanto

adaptativas, como podem indicar toxicidade (Begum, 2004). Pôde-se observar no presente trabalho que a maioria das desordens metabólicas observadas são de moderada intensidade e reversíveis.

5. CONCLUSÕES

1. O herbicida clomazone, nas concentrações utilizadas nas lavouras de arroz, causou inibição na atividade da enzima AChE, tanto no tecido cerebral, como no tecido muscular, evidenciando que este herbicida afeta o controle muscular do peixe.

2. Os parâmetros hematológicos testados apresentaram variações devido à exposição ao herbicida, o que comprova que essas análises podem ser utilizadas como indicadores de exposição a componentes tóxicos.

3. Foram observadas alterações nos parâmetros metabólicos analisados, sugerindo uma situação de maior demanda de energia, o que levou o peixe a utilizar o glicogênio muscular como fonte energética e favorecer o metabolismo anaeróbico neste tecido.

4. Os níveis de peroxidação lipídica estavam aumentados no tecido hepático em todos os períodos de exposição e no tecido cerebral nos três períodos iniciais, indicando uma situação de estresse oxidativo induzida pela exposição ao herbicida.

5. A enzima antioxidante catalase apresentou redução na sua atividade, enquanto os níveis de peroxidação lipídica aumentaram.

6. O herbicida clomazone induziu aumento na atividade das enzimas aminotransferases AST e ALT no plasma e tecido hepático.

7. O estudo histológico do tecido hepático revelou a presença de vacuolização, a qual persistiu no período de recuperação, indicando que o herbicida, nas concentrações utilizadas, demora alguns dias para induzir alterações estruturais hepáticas no jundiá, e que estas alterações podem surgir mesmo após cessar a exposição ao herbicida.

8. A maioria das desordens observadas durante a exposição ao herbicida não persistiram durante o período de recuperação, mostrando que as mudanças observadas nesse trabalho são de moderada intensidade e reversíveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, A.R.; KUMAR, A.; CHAPMAN, J.C. Inhibition of acetylcholinesterase in the Australian freshwater shrimp (*Paratya australiensis*) by profenofos. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, p. 1861-1866, 1994.

AGUIAR, L.H. de; CORRÊA, C.F. e MORAES, G. Efeitos do pesticida organofosforado methyl parathion (Folidol 600[®]) sobre o metabolismo e atividade de colinesterases do teleósteo de água doce, *Brycon cephalus* (Matrinxã) (Günther, 1869). In: **Ecotoxicologia, Perspectivas para o Século XXI**. São Carlos, SP, 2001. p. 269-279.

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M. *et al.* Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1523, p. 37-48, 2000.

ASZTALOS, B.; NÉMCSOK, J.; BENEDECZKY, L. *et al.* Comparison of effects of paraquat and methidation on enzyme activity and tissue necrosis of carp, following exposure to the pesticides singly or in combination. **Environmental Pollution**, v.5, p. 123-135, 1988.

BARCELLOS, L.J.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M. *et al.* Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage

type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, v. 232, p. 383-394, 2004.

BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. **Aquatic Toxicology**, v. 66, p. 83-92, 2004.

BEGUM, G. & VIJAYARAGHAVAN, S. Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Environmental Research A** v. 80, p. 80-83, 1999.

BIDIGARE, R.R. & KING, F.D. The measurement of glutamate dehydrogenase activity in *Praunus flexuosus* and its role in the regulation of ammonium excretion. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 70B, p. 409-413, 1981.

BIDINOTTO, P.M.; MORAES, G.; SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v.10, p. 53-60, 1997.

BOVERIS, A. & BERMÚDEZ, M.J.N. Production of superoxide anion and hydrogen peroxide in vertebrate tissues. In: **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus, 1996. p. 313-321.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 47, p. 117-124, 2000.

CARR, R. L. & CHAMBERS, J.E. Kinetic analysis of the in vitro inhibition, aging and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 139; p. 365-373, 1996.

CERÓN, J.J.; GUTIERREZ, C.; MONTES, A. Toxicological effects in rabbits induced by endosulfan, lindane and methilparation representing agricultural by products contamination. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, p. 258-265, 1995.

CHUIKO, G.M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127(C), p. 233-242, 2000.

COLBY, S.R.; LYM, R.G.; HILL, E.R. *et al.* **Herbicide Handbook of the Weed Science Society of América**. 6th ed. Illinois, 1989. p. 65-66.

COTRIN, D.S. Rizipiscicultura: um sistema agroecológico de produção. In: **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre : Emater/RS, 2000. p.14-18.

COTRIN, D.; SACKNIES, R.G.S.; VALENTE, L.A.L. *et al.* **Agricultura Sustentável: rizipiscicultura. Manual prático**. Porto Alegre: Emater/RS, 2001. 27p.

DAS, B.K. & MUKHERJEE, S.C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134(C), p. 109-121, 2003.

DEMBELÉ, K.; HAUBRUGE, E.; GASPAR, C. Recovery of acetylcholinesterase activity in the common carp (*Cyprinus carpio*) after inhibition by organophosphate and carbamate compounds. **Bulletion of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 731-742, 1999.

DUTTA, H.M. & ARENDS, D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environmental Research**, v. 91, p. 157-162, 2003.

FERNÁNDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D. *et al.* Thiobencarb-induced changes in Acetylcholinesterase activity of the

fish *Anguilla anguilla*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.72, p. 55-63, 2002.

FRAGA, C.G.; CAVANAGH, E.; CARRASQUEDO, F. *et al.* Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**, Manaus, 1996. p. 323-330.

GAAL, J.; HORVATH, Z.; EROSS, I. The effect of organophosphorus compounds on the cholinesterase activity of one summer old carps. **Aquaculture**, v. 11, p. 117-123, 1980.

GIMENO, L.; FERRANDO, M.D.; SANCHEZ, S. *et al.* Pesticide effects on eel metabolism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 31, p. 153-157, 1995.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI, G.A.R. *et al.* Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

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

GUPTA, A.B. & SRIVASTAVA, A.K. Effect of ethyl acetate on carbohydrate metabolism of common Indian catfish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 6, p. 166-170, 1982.

HINTON, D.E.; SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Toxic responses of the liver. In: Daniel, S.; Benson, W.H. **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. London, 2001. vol 1, p. 225-266.

IBAMA **Estatística da Pesca 2000 Brasil**. Grandes Regiões e Unidades da Federação, Brasil, 2001.

JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FERREIRA, C.J.A. *et al.* Risk assessment of the herbicide clomazone in the aquatic life. **International Limnology**, v. 26, p. 1724-1726, 1998.

JONSSON, C.M. & MAIA, A.H.N. Toxicidade aguda do herbicida clomazone no peixe *Hyphessobrycon scholzei*: avaliação da concentração letal mediana e de alterações no conteúdo de nutrientes. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.8, p.101-110, 1998.

JYOTHI, B. & NARAYAN, G. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 417-421, 1999.

KOZLOVSKAYA, V.I.; MAYER, F.L.; MENZIKOVA, O.V. *et al.* Cholinesterases of aquatic animals. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 132, p. 117-142, 1993.

LARSON, A.; JOHANSSON-SJOBECK, M.J.; FANGE, R. Comparative study of some haematological and biochemical blood parameters in fishes from the Skagerrak. **Journal of Fish Biology**, v. 9, p. 425-440, 1976.

LEMAIRE, P.; MATTHEWS, A.; FORLIN, L. *et al.* Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, p. 191-200, 1994.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3ªed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

LI, W.; YIN, D.; ZHOU, Y. *et al.* 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 56, p. 251-255, 2003.

LIONETTO, M.G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M.E. *et al.* Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*

in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 324-330, 2003.

MASSOULIE, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S. *et al.* Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress Neurobiology**, v. 41, p. 31-91, 1993.

MENDEL, B. & RUDNEY, H. On the type of cholinesterase present in brain tissue. **Science**, v.98, p. 201-202, 1943.

MIRON, D.S.; SILVA, L.V.F.; GOLOMBIESKI, J.I. *et al.* Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Ciência Rural**, v. 34, 2004.

MOON, T.W. Adaptation, constraint and the function of the gluconeogenic pathway. **Canadian Journal of Zoology**, v. 66, p.1059-1068, 1998.

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

PEREIRA, C.; VIJAYAN, M.M.; STOREY, K.B. *et al.* Role of glucose and insulin in regulating glycogen synthase and

phosphorylase activities in rainbow trout hepatocytes. **Journal of Comparative Physiology**, v. 165, p. 62-70, 1995.

POLEKSÍC, V. & KARAN, V. Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.43, p. 213-221, 1999.

RADÜNZ NETO, J. **Desenvolvimento de técnicas de reprodução e manejo de larvas de jundiá *Rhamdia quelen***. 77f. Dissertação (mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1981.

ROCHE, H. & BOGÉ, G. In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 125, p. 345-353, 2000.

RODRIGUES, N. R. & ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas**, 4ª ed. Londrina, PR, Brasil, 1998. p. 137-142.

ROEX, E.W.M.; KEIJZERS, R.; VAN GESTEL, C.A.M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, v. 64, p. 451-460, 2003.

SAHIB, I.K.A.; SAMBASIVA RAO, K.R.S.; RAMANA RAO, K.V. Effect of malathion on protein synthetic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mostambica* (Peters), as measured through incorporation of (14C) amino acids. **Toxicology Letters**, v.20, p. 63-67, 1984.

SANCHO, E.; CERÓN, J.J.; FERRANDO, M.D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 46, p. 81-86, 2000.

SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; FERNÁNDEZ, C. *et al.* Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 41, p. 168-175, 1998.

SASTRY, K.V. & SIDDIQUI, A.A. Chronic toxic effects of the carbamate pesticide sevin on carbohydrate metabolism in a freshwater snakehead fish, *Channa punctatus*. **Toxicology Letters**, v. 14, p. 123-130, 1982.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S. *et al.* Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 295-301, 2003.

SEVGILER, Y.; ORUÇ, E.Ö.; ÜNER, N. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 78, p. 1-8, 2004.

SOMERO, G.N. & CHILDRESS, J.J. A violation of the metabolism-size scaling paradigm: activities of glycolytic enzymes in muscle increase in larger-size fish. **Physiological Zoology**, v. 53, p. 322-337, 1980.

SZAREK, J.; SIWICKI, A.; ANDRZEJEWSKA, A. *et al.* Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**, v. 50, p. 263-266, 2000.

SZEGLETES, T.; POLYHOS, C.S.; BALINT, T. *et al.* In vivo effects of deltamethrin on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environmental Monitoring Assessment**, v. 35, p. 7-111, 1995.

TAVARES-DIAS, M; MELO, J.F.B.; MORAES, G. *et al.* Características hematológicas de teleósteos brasileiros. VI. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, v. 32, p. 693-698, 2002.

VAN DEN THILLART, G. & SMITH, H. Carbohydrate metabolism of goldfish (*Carassius auratus*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 156, p. 511-520, 1984.

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

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

WILHELM FILHO, D. & MARCON, J.L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**, Manaus, 1996. p. 299-312.

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

WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100V, n° 1/2, p. 173-176, 1991.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E.G.; MACHADO, S.L.O. *et al.* Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Chromatography**, v. 55, p. 573-577, 2002.

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X. *et al.* Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v.55, p. 167-174, 2003.

7.1 Anexo 1



Exemplares de jundiá (*Rhamdia quelen*)