

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

**PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM CARPAS
(*Cyprinus carpio*) EXPOSTOS A UMA FORMULAÇÃO
COMERCIAL DE CLOMAZONE (GAMIT[®])**

TESE DE DOUTORADO

Roberta Cattaneo

Santa Maria, RS, Brasil

2011

PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM CARPAS (*Cyprinus carpio*) EXPOSTOS A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE CLOMAZONE (GAMIT[®])

Roberta Cattaneo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vania Lucia Loro

Santa Maria, RS, Brasil

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM CARPAS (*Cyprinus carpio*)
EXPOSTOS A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE CLOMAZONE
(GAMIT[®])**

elaborada por
Roberta Cattaneo

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Vania Lucia Loro, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Heden Luiz Marques Moreira, Dr. (UFPEl)

Leonardo José Gil Barcellos, Dr. (UPF)

Nilda Berenice de Vargas Barbosa, Dr^a. (UFSM)

Maribel Antonello Rubin, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 07 de outubro de 2011.

*Dedico este trabalho aos meus pais por todo o apoio e incentivo;
Certamente este trabalho é o resultado
do amor, do carinho, da dedicação e
da experiência de vida que me foi passado por todos vocês.
Amo muito vocês!*

*Dedico também a meu noivo, Deraldo Horn,
que tem me apoiado muito nos últimos meses da minha vida, fazendo-me uma pessoa muito
mais feliz e completa.
Obrigada pelo carinho, amor e compreensão.
Amo imensamente você!!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por minha vida e por todas as oportunidades que me proporcionou.

Aos meus pais, pela vida, dedicação, carinho, incentivo, compreensão e ensinamentos que foram repassados. Amo-os muito.

Aos meus irmãos, cunhadas e afilhado que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me em minhas escolhas. Amo-os! Obrigada pelo carinho.

Ao amor da minha vida, Deraldo Horn, que é muito importante para mim, sempre dando-me muito amor, apoio e carinho. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Eu o amo muito!!

À minha orientadora, professora Vania Lucia Loro, pela oportunidade que me deu, por todos os ensinamentos, por toda paciência, confiança, dedicação e amizade. Obrigada por tudo que tenho conquistado desde que lhe conheci.

Aos meus co-orientadores (não oficialmente, mas de coração), professores Luis Antonio de Avila e Bernardo Baldisserotto, por estarem sempre disponíveis para me ajudar. Muito obrigada por tudo.

À minha melhor amiga e irmã Bárbara, que foi meu porto seguro nesta caminhada, auxiliando-me em todos os momentos. Obrigada por sua disponibilidade em sempre me ajudar. Por sua amizade, seus conselhos, seu apoio e sua companhia, que foram importantíssimos neste período.

Mais uma vez agradeço à minha colega e amiga Rita, que foi minha “abre alas” no laboratório de bioquímica adaptativa da UFSM, permitindo que eu realizasse meu sonho de ser mestre e doutora.

Agradeço à amiga e colega Bibiana pela sua fundamental contribuição neste trabalho. Sem você, ele não seria realizado.

Às amigas e colegas Adriana, Charlene, Daiane, Josieli, Tais e Cândida, que estiveram sempre presentes com suas experiências, seus conselhos sinceros, seus carinhos, seus sorrisos, enfim suas amizades.

A todos da UNICRUZ, que me apoiaram para a realização deste trabalho. Em especial às colegas e amigas, Adriana, Josiane, Ludmila e Rita; a minha aluna Camila, pela compreensão e pela ajuda nestes últimos dias de muita correria e angústia.

Aos professores do curso PPGBT, pelos ensinamentos.

Aos professores componentes da banca examinadora desta tese, pela disponibilidade e contribuições feitas para este trabalho.

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica, que me proporcionaram tudo que foi necessário para a realização deste trabalho.

À Capes, pela bolsa concedida;

Meus agradecimentos aos familiares, amigos e pessoas que de uma forma ou de outra auxiliaram na realização deste trabalho e que não mencionei nos agradecimentos seletivos.

*“Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória é o
desejo de vencer!”*

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS EM CARPAS (*Cyprinus carpio*) EXPOSTOS A UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE CLOMAZONE (GAMIT[®])

AUTORA: ROBERTA CATTANEO

ORIENTADORA: VANIA LUCIA LORO

Santa Maria, 07 de outubro de 2011

As formulações comerciais do herbicida clomazone têm sido amplamente utilizadas na agricultura e na piscicultura para controle de plantas daninhas. Os peixes podem ser afetados quando as águas de drenagem atingem os cursos d'água, acarretando um desequilíbrio no ecossistema aquático. Para avaliar uma possível contaminação foi determinada a CL₅₀ (96h) utilizando-se uma formulação comercial contendo clomazone (Gamit[®]) verificando-se parâmetros metabólicos, enzimáticos, genotóxicos e de estresse oxidativo em juvenis de carpas (*Cyprinus carpio*). Para o teste de toxicidade aguda, a fim de determinar a CL₅₀, os peixes foram expostos às concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L de clomazone em água durante 96 horas e o comportamento dos peixes foi analisado nesse período. Após a exposição, foi verificada a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo dos peixes mortos e das carpas que sobreviveram. No segundo experimento, os peixes foram expostos ao herbicida durante sete dias, tanto em condição de campo (lavoura de arroz irrigado) como de laboratório. A concentração utilizada na lavoura de arroz e no laboratório foi de 0,5 mg/L. Decorridos os períodos experimentais de 7 dias em condições de laboratório, e 7, 30 e 90 dias em condições de lavoura de arroz, foram retirados o cérebro, o fígado e o músculo dos peixes para realização das análises toxicológicas. Os parâmetros enzimáticos analisados foram a atividade da AChE, catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST). Também foram analisados alguns marcadores de estresse oxidativo, como a carbonilação de proteínas e níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido hepático. Por fim, foram avaliados alguns parâmetros metabólicos como: glicose, glicogênio, lactato, proteína, amônia e os aminoácidos em fígado e em músculo de carpas. No plasma, foram feitas as dosagens de glicose, de lactato e de proteína. Em um terceiro experimento, as carpas foram expostas a aproximadamente 15% do valor obtido para a CL₅₀ (5,0mg/L) por 7 dias. Posteriormente, foi verificada a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e foram realizados os testes do micronúcleo e cometa (expresso por índice de dano do DNA). No primeiro experimento, foi observado que os peixes expostos a 20, 30, 40 e 50 mg/L, mostraram mudanças comportamentais e a CL₅₀ (96h) foi 30,35 mg/L. Além disso, foi verificado que a atividade da enzima AChE não apresentou alterações significativas no cérebro dos peixes que morreram nas concentrações testadas (30, 40 e 50mg/L), e no músculo dos peixes mortos houve uma elevação na atividade desta enzima, quando eles foram expostos a 50 mg/L de clomazone. Já a atividade AChE diminuiu significativamente no cérebro dos peixes que sobreviveram após 96h

de exposição a 10, 20 e 30mg/L, no entanto, aumentou no músculo dos peixes sobreviventes expostos a todas as concentrações testadas. No segundo experimento, os resultados mostraram que os peixes expostos a 7 dias não apresentaram alterações na AChE em condições de campo. No entanto, uma diminuição da atividade desta enzima no músculo foi observada em condições de laboratório. Durante o mesmo período de exposição, os parâmetros de estresse oxidativo mudaram tanto em condições de campo quanto em laboratório. Entretanto, os parâmetros metabólicos foram alterados apenas em condições de campo. Após 30 e 90 dias, a atividade da AChE não se alterou em condições de campo. Distúrbios nos parâmetros de estresse oxidativo e metabolismo foram evidentes nos tecidos até 90 dias após a aplicação. Os resultados mostraram que a atividade da AChE alterou apenas em condições de laboratório, e que marcadores de estresse oxidativo associados aos parâmetros metabólicos podem ser bons indicadores de contaminação para o clomazone em *C. carpio* em condições de campo. No terceiro experimento, os resultados mostraram um aumento da formação das EROs e significativo aumento dos MN e de danos no DNA dos eritrócitos após a exposição a 5,0 mg/L do herbicida clomazone. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o herbicida estudado pode ser perigoso para as carpas quando expostas, devido ao aumento das EROs que por sua vez causam estresse oxidativo, evidenciado por alterações em marcadores enzimáticos, metabólicos, genotóxicos e de estresse oxidativo. Contudo, mais estudos serão necessários para verificar a segurança desse herbicida para os cultivos associados utilizando-se arroz e peixes.

Palavras-chave: clomazone. toxicidade. rizipiscicultura. carpas.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

TOXICOLOGICAL PARAMETERS IN CARP (*Cyprinus carpio*) EXPOSED TO A COMMERCIAL FORMULATION OF CLOMAZONE (GAMIT[®])

AUTHOR: ROBERTA CATTANEO

ADVISOR: VANIA LUCIA LORO

October 07th, 2011, Santa Maria

Commercial formulations of the herbicide clomazone have been widely used in agriculture and fish farming to control weeds. Fish can be affected when the water reaches the drainage waterways, causing an imbalance in the aquatic ecosystem. In order to evaluate a possible contamination, we determined LC₅₀ (96h) using a commercial formulation containing clomazone (Gamit[®]). We verified the metabolic, enzymatic, and genotoxic parameters as well as the oxidative stress in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Firstly, in order to determine the LC₅₀ for the acute toxicity test, the animals were exposed to the concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50 mg/L of clomazone for 96 h and the fish behavior was analyzed during this period. After exposure, we verified the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in muscle and brain of the dead fish and the live carp. Secondly, fish were exposed to the herbicide for 7 days, both in field (rice crop) and laboratory conditions. The concentration used in the rice crop and the laboratory was 0.5 mg/L. After the experimental period of 7 days under laboratory conditions and 7, 30, and 90 days under rice crop conditions, brain, liver and muscle of fish were sampled to carry out the toxicological analysis. The parameters studied were enzymatic activity of AChE, catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) in different tissues of this species. Some markers of oxidative stress, such as protein carbonylation and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in liver tissue were also analyzed. Some metabolic parameters such as glucose, glycogen, lactate, protein, and ammonia as well as amino acids in liver and muscle of carp were also measured. In plasma, we measured glucose, lactate, and protein. Thirdly, carp were exposed to approximately 15% of the LC₅₀ (5.0 mg/L) for 7 days. We verified the formation of reactive oxygen species (ROS) and micronucleus, and the comet test was performed in order to investigate the presence of DNA damage. In the first study we observed that fish exposed to 20, 30, 40 and 50 mg/L showed behavioral changes and LC₅₀ (96h) was 30.35 mg/L. In addition, it was found that the activity of the enzyme AChE showed no significant changes in the brain of the fish that died at the concentrations tested (30, 40 and 50 mg/L), and the muscle of dead fish had an increase in this enzyme when they were exposed to 50 mg/L of clomazone. The activity decreased significantly in the brain AChE of fish that remained alive after 96 h of exposure to 10, 20 and 30 mg/L, but increased in the muscle of the surviving fish exposed to all concentrations

tested. In the second experiment results showed that fish exposed to 7 days had no changes in AChE under field conditions. However, a decrease in the activity of this enzyme in muscle was observed under laboratory conditions. During the same period of exposition, the parameters of oxidative stress conditions changed both under the field and in laboratory conditions. However, metabolic parameters were altered only under field conditions. After 30 and 90 days, AChE activity did not change under field conditions. Disturbances in oxidative stress parameters and metabolism in different tissues were evident in the tissues up to 90 days after treatment. The results showed that the activity of AChE changed only under laboratory conditions, and that oxidative stress associated with metabolic parameters can be good indicators of contamination for clomazone in *C. Carpio* in rice field conditions. In the third experiment, the results showed an increased formation of ROS and a significant micronucleus (MN) and DNA damage in erythrocytes after exposure to 5.0 mg/L of the herbicide clomazone. Given these results, we can conclude that the herbicide studied can be dangerous to *Cyprinus carpio* when exposed to it due to increased ROS, which in turn cause oxidative stress evidenced by changes in enzyme markers, metabolic, genotoxic and oxidative stress. However, further studies are needed in order to verify the safety of this herbicide is when associating rice and fish.

Keywords: clomazone. toxicity. rice-fish culture. carp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Movimento dos pesticidas em ecossistemas aquáticos.....	27
FIGURA 2 – Estrutura química do clomazone.....	29
FIGURA 3 – Exemplar de <i>Cyprinus carpio</i>	31
FIGURA 4 – Degradação da acetilcolina em colina e acetato pela AChE.....	33
FIGURA 5 – Enzimas antioxidantes e danos oxidativos	35

MANUSCRITO I

FIGURE 1 – Carp mortality after exposure to commercial herbicide containing clomazone for 96 hours. *Indicate significant difference from control values ($P \leq 0.05$).....	57
FIGURE 2 – AChE activity in <i>Cyprinus carpio</i> exposed to commercial herbicide containing clomazone for 96 hours. Muscle and brain of dead (A) and alive (B) fish at the collect moment. Data represent the mean \pm SD. *Indicate significant difference from control values ($P \leq 0.05$)	58

ARTIGO I

FIGURE 1 – Clomazone concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) in water of rice paddy field	82
FIGURE 2 – Liver protein carbonyl levels in <i>Cyprinus carpio</i> exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$)	83
FIGURE 3 – Liver tissue catalase (CAT) activity in <i>Cyprinus carpio</i> exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).....	84
FIGURE 4 – Liver tissue glutathione S-transferase (GST) activity in <i>Cyprinus carpio</i> exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg/L) under laboratory	

(7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$)..... 85

FIGURE 5 – Acetylcholinesterase (AChE) activity in brain (A) and muscle (B) tissue of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$) 86

MANUSCRITO II

FIGURE 1 – *Cyprinus carpio* peripheral blood cells (AO, x1000). Cell with presence of micronuclei (arrow; A), normal cells (B) and, nuclear abnormalities in mature erythrocytes – fragmenting nuclei (C) 102

FIGURE 2 – Effects of herbicide clomazone (5.0 mg L^{-1}) on the ROS generation in total blood of *Cyprinus carpio*. The blood samples of control and clomazone fishes were incubated with DCFHDA ($20 \text{ }\mu\text{M}$) for 30 minutes. Data are expressed as mean \pm SEM and were calculated through of five independent assays. *Statistically different from control; (data were analyzed statistically by t-test, $P \leq 0.05$ were considered statistically significant) 103

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 – CL50 (96h) do herbicida clomazone (mg/L) encontrada em diferentes espécies de peixes.....	29
--	----

MANUSCRITO I

TABLE 1 – Water quality parameters through the experiment. n=3 for each tank; values are expressed as mean \pm SD.....	59
TABLE 2 – Nominal and average measured concentrations of clomazone during the experiment. n=3 for each tank; values are expressed as mean \pm SD.....	59

ARTIGO I

TABLE 1 – LPO measured through TBARS levels (nmol MDA mg ⁻¹ of protein) in brain, liver and muscle of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to commercial herbicide containing clomazone under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days . Data represent the mean \pm SD (n=30). Different letters indicate significant difference between control and herbicide group ($p \leq 0.05$).....	79
TABLE 2 – Liver, muscle and plasma metabolites of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to commercial herbicide containing clomazone under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days . Data represent the mean \pm SD (n=30). Glucose, glycogen and lactate in tissue were expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ tissue. Protein was expressed in mg g ⁻¹ tissue or mg mL ⁻¹ plasma, lactate plasma expressed in $\mu\text{mol mL}^{-1}$ and glucose in mg dL ⁻¹ plasma. Different letters indicate significant difference between control and herbicide group ($p \leq 0.05$). NM (not measured)	80

MANUSCRITO II

TABLE 1 – Water parameters through the experiment. n=3 for each tank; values are expressed as mean \pm SD..... 102

TABLE 2 – Micronuclei (MN) frequencies, nuclear abnormalities in erythrocytes (NAE) and index damage (ID) in erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to waterborne clomazone concentration (5.0 mg L⁻¹) for 7 days. *Statistically significant compared to control (t-test, for Independent Samples by Variables, $P \leq 0.05$) 103

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACh: Acetilcolina
ASCh: Acetylcholine
AChE: Acetilcolinesterase
BChE: Butirilcolinesterase
CAT: Catalase
CIT-RS: Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul
CL₅₀ (96h): Concentração letal que causa a mortalidade de 50% da população em 96 horas de exposição
DCFHDA: 2,7 – diacetato diclorofluorescência
DNA: Ácido desoxirribonucléico
DTNB: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
EROs: Espécies reativas de oxigênio
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
GPx: Glutathione peroxidase
GSH: Glutathione reduzida
GST: Glutathione S-transferase
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
ID: Índice de danos
 \cdot OH: Radical hidroxila
LPO: Peroxidação lipídica
MDA: Malondialdeído
MN: Micronúcleo
O₂⁻: Ânion superóxido
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
PPA: Potencial de Periculosidade Ambiental
SOD: Superóxido dismutase
TBA: Ácido tiobarbitúrico
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
(2,4-D): Ácido 2,4-dichlorofenoxiacético

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 Pesticidas e a Contaminação Ambiental	25
3.2 Clomazone	27
3.3 Carpa (Cyprinus carpio L. 1758)	29
3.4 Enzima Acetilcolinesterase	31
3.5 Estresse Oxidativo	33
3.5.1 Parâmetros pró-Oxidantes	34
3.5.2 Sistema de Defesa Antioxante	37
3.6 Parâmetros Metabólicos	39
3.7 Parâmetros Genotóxicos	41
4 RESULTADOS	45
4.1 Manuscrito I: Effects of clomazone herbicide in carp (Cyprinus carpio) fingerlings. Roberta Cattaneo, Daiane Ferreira, Barbara Clasen, Charlene Carvalho de Menezes, Denise Miron, Bernardo Baldisserotto, Vania Lucia Loro..	45
4.2 Artigo I: Tissue Biochemical Alterations of Cyprinus carpio Exposed to Commercial Herbicide Containing Clomazone Under Rice-field conditions Roberta Cattaneo, Bibiana Silveira Moraes, Vania Lucia Loro, Alexandra Pretto, Charlene Menezes, Gerson Meneguetti Sarzi Sartori, Barbara Clasen, Luis Antonio de Avila, Enio Marchesan e Renato Zanella	60
4.3 Manuscrito II: Genotoxic and formation of reactive oxygen species in peripheral blood of carp (Cyprinus carpio) exposed to the clomazone herbicide. Roberta Cattaneo, Alessandra P. Vargas, Alexssandro G. Becker, Douglas M. Ceolin, Barbara Clasen, Vânia Lucia Loro, Bernardo Baldisserotto, João Batista Teixeira da Rocha. 87	87
5 DISCUSSÃO	105

6 CONCLUSÕES	117
7 PERPECTIVAS.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
DEMAIS TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O CURSO DE DOUTORADO	137

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita da seguinte forma: primeiramente são apresentados a **INTRODUÇÃO**, os **OBJETIVOS** e a **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.

A seguir, os **RESULTADOS** são apresentados na forma de dois **MANUSCRITOS** e um **ARTIGO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e artigo representando a íntegra deste trabalho.

No final da dissertação, encontram-se os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, nos quais há interpretações e comentários gerais sobre os resultados contidos neste estudo.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação.

No **ÚLTIMO ITEM**, encontram-se os demais trabalhos desenvolvidos durante o Curso de Doutorado.

1 INTRODUÇÃO

Devido à intensificação das práticas agrícolas, os pesticidas têm sido amplamente utilizados na agricultura com a finalidade de aumentar a produção, bem como, combater insetos, ervas daninhas e, ainda, fungos que possam atacar as culturas. Nos últimos anos, seu uso tem se intensificado principalmente no Brasil, que se tornou um dos maiores consumidores desses produtos químicos, ficando atrás somente do Japão e dos Estados Unidos (DAMS, 2006). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2011), atualmente o Brasil se consolida como maior mercado e com maior ritmo de expansão no consumo de agrotóxicos em todo o mundo.

A presença de poluentes em ambientes aquáticos pode afetar a saúde e a sobrevivência dos peixes (DEZFULI et al., 2003). As águas que saem das lavouras, por exemplo, podem afetar diretamente ou indiretamente a vida de muitos organismos não-alvo como os peixes (ORUÇ; ÜNER, 1999; BRETAUD et al., 2000). Recentemente, um grande número de estudos tem avaliado os efeitos de pesticidas sobre os organismos aquáticos, principalmente estudos que utilizam doses sub-letais dos produtos (CRESTANI et al., 2006; GLUSCZAK et al., 2007; MORAES et al., 2007; FONSECA et al., 2008). Os processos de transporte e de impacto sobre organismos não-alvo são coordenados pelas taxas de degradação e pela biodisponibilidade desses pesticidas no solo ou na água. A biodisponibilidade do pesticida depende de suas características físico-químicas, bem como, das condições clima/solo onde ele se encontra. Os efeitos sobre os peixes variam de acordo com a espécie, o estágio de desenvolvimento, o produto aplicado, a dose, a concentração do produto e o tempo de exposição (GLUSCZAK et al., 2006; MORAES et al., 2007; CATTANEO et al., 2008).

Entre os efeitos deletérios provocados pelos pesticidas em peixes, podemos citar a indução de estresse oxidativo (ÜNER et al., 2006; TONI et al., 2010; CATTANEO et al., 2011). O estado de estresse oxidativo é decorrente de um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes devido à depleção destes ou à superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), ou ambos, resultando em danos ao organismo (ISIK; CELIK, 2008), sendo que a

maioria provém do metabolismo do O_2 , utiliza-se com maior frequência o termo EROs. Estas EROs podem modificar todas as macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídios e ácido desoxirribonucléico (DNA) (SIES, 1993). Em peixes também já foram relatados a indução de alterações metabólicas e mutagênicas (ABDUL FARAH et al., 2003; VENTURA et al., 2008; NWANI et al., 2010). Em nível de proteínas estas espécies reativas podem ocasionar modificações nos resíduos dos aminoácidos e formação de proteína carbonilada. Alguns estudos sugerem que a dosagem de carbonilação de proteínas em peixes pode ser usada como biomarcador complementar de estresse oxidativo (ALMROTH et al., 2005; PARVEZ; RAISUDDIN, 2005). A lipoperoxidação (LPO) é o resultado da atuação dos radicais livres sobre as membranas biológicas que são ricas em ácidos graxos (ORUÇ; USTA, 2007). Dentre os lipídios, os ácidos graxos poliinsaturados são os mais sensíveis ao ataque das EROs (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). Assim, o processo de LPO é uma consequência importante do estresse oxidativo e tem sido investigado extensivamente em peixes, sendo expresso pelos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (MIRON et al., 2008; FERREIRA et al., 2010).

Mecanismos de defesa (sistema antioxidante) foram desenvolvidos por diferentes organismos para prevenir e interceptar a formação de oxiradicais e ainda reparar moléculas oxidadas (AHMAD et al., 2000; LI et al., 2003). Assim, a célula possui uma série de defesas capazes de evitar ou combater o efeito deletério dessas EROs geradas pelo metabolismo aeróbio. O sistema de defesa é formado por antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que podem ser produzidos endogenamente ou adquiridos pela dieta. Dentre as principais enzimas que combatem a formação de EROs, estão a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), as quais podem atenuar a sensibilidade das células aos oxidantes (ORUÇ; ÜNER, 2000). A SOD catalisa a conversão do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é metabolizado pela CAT em oxigênio molecular e água (VAN DER OOST et al., 2003). Glutathione-S-transferases (GSTs) são um grupo de isoenzimas multifuncionais envolvidas na biotransformação e detoxificação de xenobióticos (CNUBBEN, 2001). Um papel crucial da GST é proteger as células auxiliando na detoxificação contra danos oxidativos e produtos peroxidativos (VAN DER OOST et al., 2003).

Além das defesas enzimáticas, componentes do sistema de defesa antioxidante não-enzimático, atuam impedindo reações de auto-oxidação sob

condições de estresse oxidativo. O ácido ascórbico tem sido considerado como um fator essencial para atenuar alguns dos efeitos tóxicos dos radicais livres (SAYEED et al., 2003). A glutathiona reduzida (GSH) é o principal tiol não-protéico e um dos principais agentes redutores encontrados nas células. Processos relacionados à GSH desempenham um papel central na defesa antioxidante por contribuir com inúmeros processos como o combate aos radicais livres, redução de peróxidos e detoxificação de compostos eletrofílicos (CNUBBEN et al., 2001).

A medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) também é um dos parâmetros utilizados para avaliar a toxicidade de herbicidas em peixes. A AChE tem sido usada como um marcador de exposição a pesticidas em peixes (SANCHO et al., 2000, MIRON et al., 2005, CRESTANI et al., 2007). A inibição da AChE induz um acúmulo de acetilcolina levando à super-estimulação de receptores em células-alvo. Como consequência, esses distúrbios podem interferir no sistema colinérgico e afetar a locomoção e o equilíbrio de organismos não alvo como os peixes (FERNÁNDEZ-VEGA et al., 2002; MIRON et al., 2005). Além disso, parâmetros metabólicos também são muito usados para avaliar as condições de saúde dos peixes após exposição a pesticidas. Estudos têm demonstrado que alterações no metabolismo de proteínas e carboidratos têm ocorrido em peixes que foram submetidos a uma condição de estresse (CRESTANI et al., 2006; FONSECA et al., 2008; CATTANEO et al., 2008; SANCHO et al., 2010). Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de investigar alterações bioquímicas provocadas em peixes expostos a pesticidas, tanto em condições de campo quanto em laboratório (CATTANEO et al., 2008; MORAES et al., 2009; TONI et al., 2010).

Assim, vários estudos toxicológicos são utilizados para estimar o impacto dos produtos químicos, incluindo os dos pesticidas sobre as unidades populacionais em ecossistemas aquáticos. Neste estudo, será avaliado o efeito do herbicida clomazone (Gamit[®]) que é um inibidor da síntese dos carotenóides, os quais são responsáveis pela pigmentação da planta e que é fundamental para a fotossíntese. Esse herbicida está disponível em formulações concentradas e emulsionáveis; é um herbicida de amplo espectro, usado para controle de gramíneas anuais e plantas daninhas no algodão, ervilhas, abóboras, soja, batata doce, tabaco, e trigo. O Gamit[®] tem alto poder de contaminação, pois 90% de águas próximas às plantações são contaminadas com clomazone (ZANELLA et al., 2002). Com relação

aos possíveis efeitos tóxicos, o clomazone afeta diferentes parâmetros em peixes nativos como piavas (MIRON et al., 2005, MORAES et al., 2007), jundiás (CRESTANI et al., 2006, 2007) e carpas (CATTANEO et al., 2011; TONI et al., 2010, 2011). Sua alta hidrossolubilidade (1100 mg/L) pode ser responsável, pelo menos em parte, pela sua toxicidade (COLBY et al., 1989). Entretanto, para peixes cultivados, como as carpas, ainda não existem dados publicados referentes à toxicidade do herbicida clomazone.

A carpa (*Cyprinus carpio*) é originária da Europa Oriental e da Ásia Ocidental. Atualmente, seu cultivo ocorre em todos os continentes, devido a sua rusticidade, resistência a diferentes temperaturas e facilidade de criação. É uma espécie onívora que se alimenta de invertebrados, plantas, algas, consome larvas de insetos e crustáceos, podendo alimentar-se também de pequenos peixes (QUEROL et al., 2005).

Tendo em vista que no sul do Brasil, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, é comum encontrar a prática da aquicultura complementar à agricultura, uma vez que as lagoas utilizadas para piscicultura encontram-se próximas ou dentro de áreas agrícolas, ou ainda, recebem água que circula pelo solo cultivado (CERICATO et al., 2008), tornam-se de suma importância estudos avaliando a toxicidade de herbicidas utilizados em lavoura de arroz, sobre os organismos de peixes de interesse comercial como as carpas. Assim, os objetivos deste estudo foram:

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do herbicida clomazone para carpas e seus efeitos sobre os parâmetros metabólicos, enzimáticos, genotóxicos e de estresse oxidativo.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a CL_{50} -96h do herbicida clomazone para carpas húngaras.
- Verificar se as diferentes concentrações do herbicida clomazone utilizadas para determinação da CL_{50} -96h provocam alterações comportamentais nas carpas húngaras.
- Verificar se as diferentes concentrações do herbicida clomazone utilizadas na determinação da CL_{50} -96h causam alterações na atividade da enzima AChE em cérebro e músculo de carpas húngaras.
- Verificar o efeito da exposição por 7, 30 e 90 dias a 0,5 mg/L do clomazone em condições de campo e de laboratório sobre a enzima GST em fígado de carpas húngaras.
- Verificar o efeito da exposição por 7, 30 e 90 dias a 0,5 mg/L do herbicida clomazone em condições de campo e de laboratório sobre a enzima CAT em fígado de carpas húngaras.
- Verificar o efeito da exposição por 7, 30 e 90 dias a 0,5 mg/L do herbicida clomazone em condições de campo e de laboratório sobre a enzima AChE em cérebro e músculo de carpas húngaras.
- Verificar o efeito da exposição por 7, 30 e 90 dias a 0,5 mg/L do herbicida clomazone em condições de campo e de laboratório sobre os níveis de TBARS em fígado, cérebro e músculo de carpas húngaras.

- Verificar o efeito da exposição por 7, 30 e 90 dias a 0,5 mg/L do herbicida clomazone em condições de campo e de laboratório sobre carbonilação de proteínas em fígado de carpas húngaras.

- Verificar o efeito da exposição por 7, 30 e 90 dias a 0,5 mg/L do herbicida clomazone em condições de campo e de laboratório sobre os parâmetros metabólicos (proteína, lactato, glicose, glicogênio, aminoácido e amônia total) no fígado, músculo e plasma de carpas húngaras.

- Verificar o efeito da exposição por 7 dias a 5,0 mg/L do herbicida clomazone sobre a formação de EROs e sobre a genotoxicidade em eritrócitos de carpas húngaras.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pesticidas e a contaminação ambiental

De acordo com a legislação brasileira, são chamados pesticidas ou agrotóxicos, os produtos e os agentes de processos físicos, químicos e biológicos empregados com o intuito de beneficiar a produção agrícola (BRASIL, 1998). Os pesticidas podem ser classificados em diferentes grupos, de acordo com a praga que atacam, sendo eles inseticidas, herbicidas, fungicidas, entre outros.

Devido à eficiência desses produtos químicos no combate às pragas das lavouras, os pesticidas têm sido amplamente utilizados nas plantações com o intuito de aumentar a produtividade e a lucratividade. No entanto, o uso contínuo desses produtos pode ser tóxico, podendo até mesmo ser mutagênico e cancerígeno (PRIMEL et al., 2005). No último relatório anual, publicado pelo Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul (CIT-RS, 2011), referente aos atendimentos realizados no ano de 2008, foram relatados 950 atendimentos por suspeitas de intoxicação por agrotóxicos, sendo desse total, 318 por acidentes ocupacionais. Segundo a ANVISA (2011), em termos de toxicidade, os pesticidas estão distribuídos em quatro classes toxicológicas: Classe I – Pesticidas extremamente tóxicos; Classe II – Altamente tóxicos; Classe III – Medianamente tóxicos; Classe IV – Pouco tóxicos. A partir de 1996, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), passou a classificar os pesticidas quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental (PPA), considerando parâmetros como bioacumulação, transporte, persistência. Assim, segundo o PPA os pesticidas são classificados em: altamente perigosos, perigosos e pouco perigosos.

A contaminação dos ambientes aquáticos por esses pesticidas, oriundos das práticas agrícolas, tornou-se um problema de grande importância mundial. Atualmente, muitos estudos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar alterações causadas por estes xenobióticos em organismos aquáticos (SANCHO et al., 2000). Entre as diferentes culturas, o arroz ocupa um lugar de destaque devido aos

“potenciais níveis de contaminação das águas superficiais com produtos químicos de origem agrícola”. A extensa área cultivada, o elevado número de tratamentos fitossanitários efetuados ao longo do seu ciclo natural, a aplicação de alguns pesticidas de elevada toxicidade para a biota aquática e sua estreita relação com o meio hídrico são fatores preponderantes para tal classificação. Uma vez no ambiente, os pesticidas tenderão a distribuir-se pelos diferentes compartimentos ambientais (água, solo, sedimento, ar e biota) de acordo com suas propriedades físico-químicas e as características do meio (SILVA; SANTOS, 2007). De acordo com Pan; Dutta (1998), existem duas maneiras principais através das quais os pesticidas podem se concentrar no ambiente aquático: sua persistência no solo, que ao ser lixiviado libera-os para os cursos de água, e também através de sua evaporação para a atmosfera chegando até esses meios por precipitação (Figura 1).

Além da possibilidade de contaminação dos cursos de água naturais, temos os sistemas de criação de peixes, prática muito empregada na região Sul da América do Sul, em função de grande parte dos criadouros localizar-se próximo ou dentro de áreas de plantações agrícolas, mantendo assim, um contato direto dos animais com os produtos químicos utilizados nas lavouras. Isso ocorre porque os pesticidas, ao chegarem até os corpos d'água, provocam a contaminação desses locais, causando sérios danos a organismos aquáticos, incluindo os peixes, o que pode resultar em alterações significativas em determinados processos bioquímicos e fisiológicos desses animais (SHWETA et al., 2007). Segundo Sancho et al. (2010), os peixes são particularmente sensíveis à influência de pesticidas, uma vez que eles são capazes de absorver e ter esses xenobióticos dissolvidos na água, via transporte passivo. Assim, os peixes têm sido frequentemente usados como indicadores de poluição em ambientes aquáticos exibindo um grande papel ecológico, por estarem presentes em quase todo meio aquático e por serem considerados o topo da cadeia alimentar aquática (LINDE-ARIAS et al., 2008).

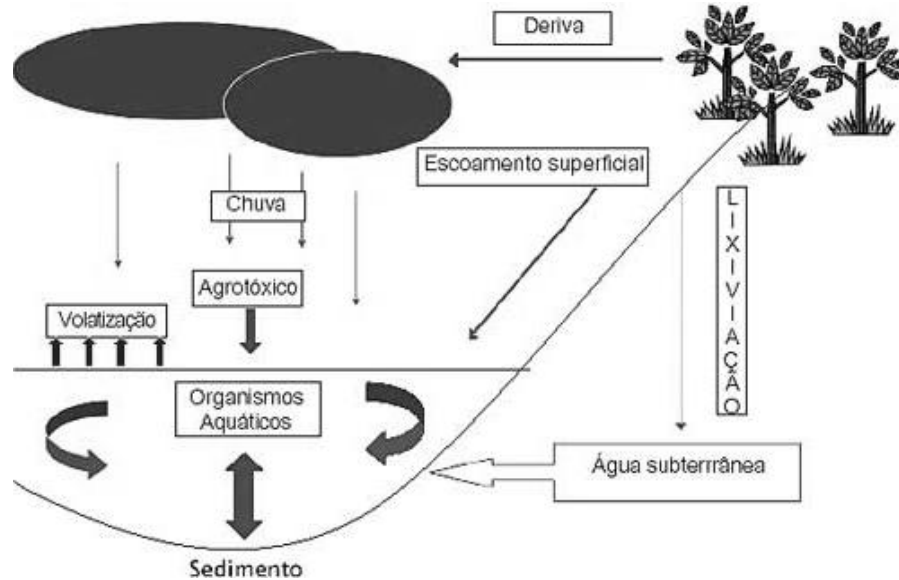


Figura 1: Movimento dos pesticidas em ecossistemas aquáticos (Adaptado de Silva e Santos, 2007)

3.2 Clomazone

Comercializado na forma comercial de concentrado emulsionável 36 ou 50% (Gamit[®], COMMAND 4EC[®]), o herbicida clomazone 2-[(2-chlorophenyl) methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone (Figura 2) é registrado no Brasil para o controle de plantas daninhas em pré-emergência em diversas culturas, dentre elas o arroz irrigado. Pertence ao grupo químico das isoxazolidinonas, é absorvido pelas raízes e move-se no xilema até as folhas das plantas (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Os herbicidas deste grupo causam inibição da síntese de carotenóides. O caroteno é um pigmento das plantas responsável, dentre outras funções, pela proteção da clorofila da fotooxidação, portanto as plantas suscetíveis apresentam o albinismo como o principal sintoma, causando uma aparência descorada (CHRISTOFFOLETI et al., 2004). Além disso, este herbicida pré e pós-emergente de ação sistêmica é muito utilizado no cultivo de arroz irrigado, na concentração de 0,4 – 0,7mg/L, conforme Rodrigues e Almeida (2005) relatam.

O clomazone tem solubilidade em água de 1100 mg/L (25°C) e pressão de vapor de 19.2 mPa (25°C). A meia-vida do clomazone no solo é de 24 dias, mas esse período pode variar com o tipo do solo e as circunstâncias ambientais

(SENSEMAN, 2007). Zanella et al. (2002) relataram que os resíduos de clomazone podem durar até 130 dias em águas agrícolas e serem detectados em 90% das amostras de água coletadas em cursos perto de regiões de cultivo de arroz. Assim, esse herbicida pode chegar a rios, lagos, córregos e nascentes de água através do vazamento constante de água a partir destas culturas em épocas de plantio e colheita ou durante a lixiviação das chuvas (VAN DER OOST et al., 2003), atingindo os organismos não-alvo, como peixes e causar distúrbios na função endócrina, que estão diretamente ligados a problemas na reprodução e à mortalidade (KIME et al., 1995).

O clomazone é considerado medianamente tóxico para o meio ambiente, estando na Classe III de toxicidade segundo a ANVISA (2011). Assim, em função da toxicidade desse herbicida, há mais de uma década vêm sendo realizados estudos sobre a toxicidade do herbicida clomazone sobre diferentes espécies de peixes, como podemos verificar na tabela 1. Miron et al. (2005) relataram que após a exposição de jundiás (*R. quelen*) a altas concentrações (5, 10 ou 20 mg/L) do herbicida clomazone, a atividade da enzima AChE foi inibida em até 83% no cérebro e 89% no músculo. Em outro estudo com *Rhamdia quelen* e clomazone (0,5 e 1,0mg/L), Crestani et al. (2006) observaram que após uma exposição de 192 horas, os peixes mostraram alterações em alguns parâmetros metabólicos, porém as concentrações utilizadas neste estudo foram consideradas seguras para esta espécie, pois no período de recuperação em água livre de herbicida, esses parâmetros retornaram aos valores controle. Além disso, estudos mais recentes, relataram ocorrência de estresse oxidativo e interferência na atividade da enzima acetilcolinesterase em piavas (*Leporinus obtusidens*) expostas ao clomazone por 30 e 90 dias respectivamente, em condições de lavoura de arroz irrigado (MORAES et al., 2007, 2009). Crestani et al. (2007) identificaram a ocorrência de estresse oxidativo, inibição da atividade da enzima AChE cerebral e muscular e presença de vacúolos nos hepatócitos de *Rhamdia quelen* expostas a 0,5 e 1,0 mg/L de clomazone por 12, 24, 48 e 192 horas.

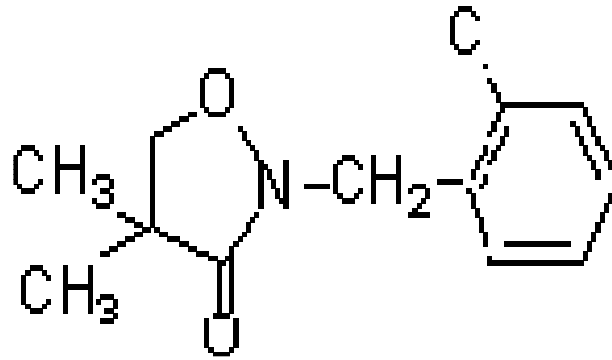


Figura 2: Estrutura química do herbicida clomazone (adaptado de Senseman, 2007).

Tabela 1: CL₅₀ (96 h) do herbicida clomazone (mg/L) encontrada para diferentes espécies.

Espécie de peixe	CL ₅₀ (96 h) para clomazone (mg/L)
Truta-arco-íris ¹	19,00
Jundiá ²	7,32
Bluegill ³	34,00
Tetra-risca-negra ⁴	27,30
Carpa Comum ⁵	9,76

Fonte: ^{1,3}VENCIL et al. (2002); ²MIRON et al. (2005); ⁴JONSSON et al. (1998); ⁵RESGALLA Jr et al. (2002).

3.3 Carpa (*Cyprinus carpio* L.1758)

A carpa é um peixe teleosteo da família Cyprinidae, gênero *Cyprinus*, espécie *Cyprinus carpio* L. 1758 (Figura 3). É uma espécie exótica, originária da Europa Oriental e da Ásia Ocidental e cultivada na China há mais de 2.000 anos (CASTAGNOLLI; CYRINO, 1986). Atualmente seu cultivo ocorre em todos os continentes, devido a sua rusticidade, por resistirem a grandes diferenças de temperatura e por sua facilidade de criação (QUEROL et al., 2005), sendo segundo Vandeputte (2003) e Toni et al. (2011), uma das espécies de peixe mais importantes cultivadas no mundo hoje em dia. Em 1887, veio para a América, sendo aclimatada nos Estados Unidos. No Brasil, onde se adaptou com grande facilidade, foi

introduzida no Estado de São Paulo, em 1904, entretanto, as criações intensivas só tiveram início na década de 30 (GALLI; TORLONI, 1989).

No Rio Grande do Sul, as carpas (várias espécies) constituem o grupo de peixes mais cultivados (BALDISSEROTTO, 2008) e empregados em sistemas de policultivo (SILVA et al., 2006; TONI et al., 2011), visando aumentar a produtividade por uma utilização mais eficiente dos recursos ecológicos disponíveis no meio aquático. Além disso, essa espécie de peixe tem sido empregada em pesquisas para adoção do sistema de rizipiscicultura no Rio Grande do Sul, uma vez que já existem estudos relatando um aumento no rendimento do arroz irrigado quando cultivado em consórcio com peixes em outros países (MARCHEZAN et al., 2006).

Apesar de ser um peixe de águas paradas e quentes, segundo Moreira et al. (2001), as carpas se adaptam a uma ampla faixa de temperatura. Assim, hoje são considerados animais cosmopolitas, tendo ótimo crescimento em temperatura média de 28°C, com níveis de oxigênio entre 7 e 9 mg/L e, seu crescimento afetado somente abaixo de 15°C (GALLI; TORLONI, 1989). Não se reproduzem quando a temperatura cai abaixo de 20°C e cessam a ingestão de alimentos quando a temperatura da água é inferior a 4°C (CASTAGNOLLI; CYRINO, 1986). Resistem bem às quedas do teor de oxigênio dissolvido, suportando até 3,2 mg/L. Porém, param de se alimentar com nível de 2,5 mg/L e podem morrer com 0,8 mg/L (MENEZES; YANCEY, 1984; GALLI; TORLONI, 1989). Apresentam crescimento precoce, existindo uma alta relação entre altura e comprimento do corpo podendo atingir mais de 20 kg (MOREIRA et al., 2001).

É uma espécie onívora, que se alimenta de invertebrados, plantas, algas, consome larvas de insetos e crustáceos, podendo alimentar-se também de pequenos peixes (QUEROL et al., 2005). Por ser a carpa cosmopolita, surgiram várias raças, segundo a região e o método de criação. As raças diferem principalmente por características ligadas ao formato, às escamas e ao tamanho da cabeça em relação ao corpo. A carpa Húngara (linhagem da carpa espelho procedente da Hungria), por exemplo, possui um pequeno número de escamas, sendo estas de maior tamanho que as das outras variedades de carpas, dispostas em três fileiras, na região dorsal, sobre a linha lateral e na região ventral (MOREIRA et al., 2001).



Figura 3 – Exemplar de Carpa Húngara (*Cyprinus carpio*).

3.4 Enzima Acetilcolinesterase

Segundo Oga (2003), a acetilcolinesterase (colinesterase eritrocitária ou “verdadeira”) geralmente constitui um indicador mais específico e sensível que a butirilcolinesterase (colinesterase plasmática ou pseudocolinesterase), pois a molécula alvo é a mesma que é responsável pela toxicidade aguda no sistema nervoso central. Entretanto, compostos, tais como, o malathion e o diclorvos (organofosforados) inibem primeiramente a butirilcolinesterase, fazendo deste parâmetro o indicador mais sensível de exposição, todavia, esta inibição pode não vir associada com sintomas de intoxicação. Assim, a acetilcolinesterase, no caso de organofosforados, é mais usada para intoxicações crônicas, pois nesse caso esta enzima é inibida de forma mais lenta e menos intensa que a butirilcolinesterase. Com relação às funções neurais, as colinesterases desempenham papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise dos ésteres de colina e a detoxificação de xenobióticos (BRETAUD et al., 2000; ROEX et al., 2003). Elas dividem-se em duas famílias principais: a acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), que hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a acetilcolina), e a butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) que prefere hidrolisar outros tipos de ésteres como a butirilcolina (NIGG; KNAAK, 2000).

A enzima acetilcolinesterase está presente no sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP) e também nos glóbulos vermelhos do sangue (YI et al., 2006). Em cérebro de peixe encontramos apenas acetilcolinesterase, enquanto que o tecido muscular contém tanto acetilcolinesterase quanto

butirilcolinesterase (STURM et al., 2000). Além disso, dependendo da colinesterase considerada, a concentração do substrato pode influenciar a atividade enzimática, já que a AChE é inibida por excesso de substrato enquanto a BChE não apresenta tal efeito (NUNES-TAVARES et al., 2002).

Atualmente, a atividade desta enzima vem sendo usada como indicador de toxicidade de pesticidas carbamatos e organofosforados (SANCHO et al., 2000; YI et al., 2006; MODESTO; MARTINEZ, 2010), que são conhecidos por inibirem a AChE de maneira reversível (carbamatos) ou irreversível (organofosforados) (OGA, 2003). Porém, em outros estudos, verificou-se que diferentes classes de agrotóxicos também causaram alterações na atividade da AChE em cérebro ou músculo de peixes (MIRON et al., 2005; CRESTANI et al., 2006; MORAES et al., 2007).

Essa enzima é responsável por catalisar a degradação da acetilcolina (ACh) em colina e acetato na fenda sináptica (Figura 4). Assim, caso a atividade da AChE estiver diminuída pela presença de um inibidor, a acetilcolina liberada será acumulada na sinapse colinérgica central e junções neuromusculares, levando a uma super estimulação das células-alvo. Como consequência, esses distúrbios podem afetar a locomoção e o equilíbrio dos organismos expostos (PAN; DUTTA et al., 1998; SAGLIO; TRIJASSE, 1998; SANCHO et al., 2000; FERNÁNDEZ-VEGA et al., 2002; MIRON et al., 2005).

Em geral, os peixes intoxicados com inseticidas anticolinesterásicos mostram sinais de paralisia muscular, hiperatividade e perda de equilíbrio (CERÓN et al., 1996). Dutta e Arends (2003), avaliando o inseticida endosulfan, encontraram uma significativa inibição da atividade da AChE em cérebro de *Lepomis macrochirus* quando expostos por até uma semana à concentração de 1,2 µg/L do produto. Gluszczak et al. (2006) em outro estudo, verificaram que a atividade da AChE foi inibida em cérebro de piavas (*Leporinus obtusidens*) quando esses peixes foram expostos a 3, 6, 10 e 20 mg/L de uma formulação comercial do herbicida glifosato (Roundup®) por um período de 96h. Em um experimento realizado no campo (em lavoura de arroz irrigado) por um período de 30 dias de exposição, foi observada a inibição da enzima em cérebro de piavas após serem expostas às formulações comerciais dos herbicidas clomazone e quinclorac (MORAES et al., 2007), esta inibição também foi evidenciada em experimento com carpas expostas ao herbicida clomazone e bispyribac-sodium, penoxsulam (TONI et al., 2010; CATTANEO et al., 2011).

Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que a atividade da AChE em tecidos de peixes pode variar de acordo com a espécie, com o tempo de exposição, com a condição experimental em que o peixe se encontra e com o tipo de tóxico ao qual o peixe é exposto (MIRON et al., 2005; CRESTANI et al., 2006, 2007; MORAES et al., 2007, 2009; GLUSCZAK et al., 2007; FONSECA et al., 2008; CATTANEO et al., 2011). Como também pode variar dependendo de outros fatores como, ciclo reprodutivo, sexo e idade (YI et al., 2006). Conforme foi observado por Chuiko (2000), em um estudo sobre a diferença da atividade da AChE em diferentes espécies de peixe, concluindo que o nível da atividade específica dessa enzima no cérebro de peixes, que representavam a família Cyprinidae, foi maior que o das famílias Percidae e Esocidae.

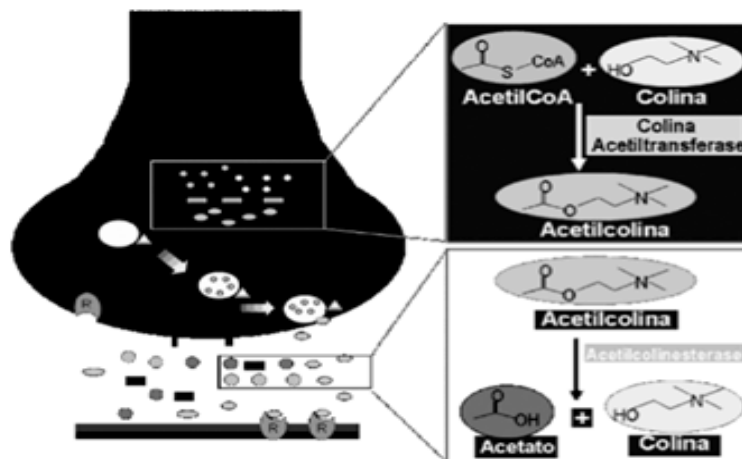


Figura 4 – Hidrólise da acetilcolina em colina e acetato pela AChE (Adaptado de Ventura et al., 2010).

3.5 Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo é definido como uma perturbação do equilíbrio entre componentes pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, gerando potencial dano. Sendo o resultado de um de três fatores: (1) aumento na geração de EROs, através da acumulação de intermediários reativos; (2) prejuízo

do sistema de defesa antioxidante (inibição de enzimas antioxidantes, depleção de antioxidantes não-enzimáticos); (3) incapacidade para reparar dano oxidativo (ALY et al., 2010).

3.5.1 Parâmetros Pró-Oxidantes

Radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados na última camada. Em condições biológicas, as moléculas encontram-se pareadas, sem a presença de radicais, porém quando ocorrem alterações nesse meio, esses radicais se formam e podem desencadear efeitos patológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). No entanto, o termo radical livre não é o mais adequado para se referir aos agentes reativos patogênicos, pois alguns não possuem elétrons desemparelhados na última camada. Considerando-se então que a maioria provém do metabolismo do O_2 , utiliza-se os termos “espécies reativas de oxigênio” (EROs) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As principais EROs produzidas durante o metabolismo basal normal das células aeróbicas são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso causa efeitos prejudiciais, tais como a oxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS, 2006).

Agentes xenobióticos, incluindo os pesticidas, podem induzir estresse oxidativo uma vez que têm o potencial de produzir EROs que induzem danos oxidativos em macromoléculas incluindo DNA, proteínas e lipídios (Figura 5). A produção de EROs e o conseqüente dano oxidativo podem estar envolvidos nos mecanismos de toxicidade em organismos aquáticos que vivem em ambientes receptores de água contaminada (LIVINGSTONE et al., 2001).

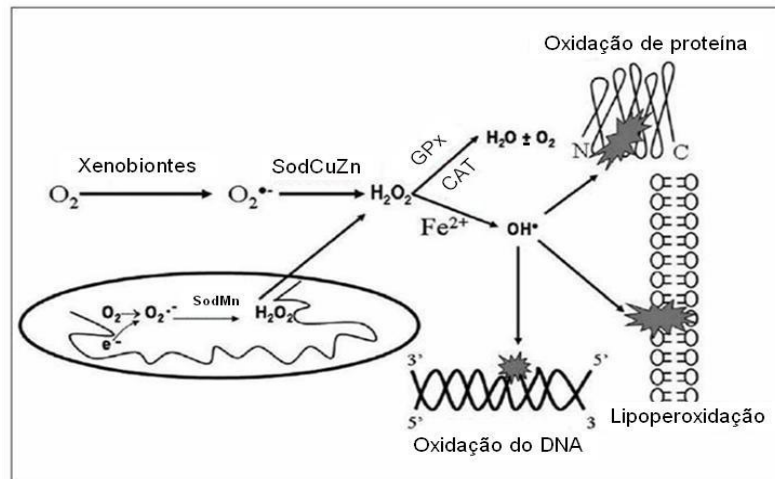


Figura 5: Enzimas antioxidantes e danos oxidativos (Adaptado de Trevisan, 2008).

De fato, estudos têm comprovado que os pesticidas podem induzir estresse oxidativo em peixes, levando à geração de radicais livres e causando peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas (KEHRER, 1993; ALMROTH et al., 2005; TONI et al., 2010). Sob condições fisiológicas normais, EROs são detoxificadas e removidas continuamente da célula pelo sistema de defesa antioxidante. No entanto, frente a uma perturbação, como por exemplo, a exposição de organismos a pesticidas, a produção de EROs excede a capacidade dos antioxidantes celulares, prevalecendo sobre sua degradação e levando a significativo dano oxidativo (MATÉS, 2000; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006).

Peroxidação lipídica é um complexo processo resultante de reações de radicais livres com membranas biológicas, as quais são ricas em ácidos graxos poliinsaturados. Nesse processo, são formados hidroperóxidos lipídicos os quais decompõem ligações duplas de ácidos graxos insaturados e destroem a membrana lipídica (ORUÇ; USTA, 2007). Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos, como etano e pentano, e os aldeídos, como o MDA (malondialdeído). Esse, por sua vez, é bem caracterizado por ser um produto da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados podendo reagir com o TBA (ácido tiobarbirúrico) produzindo um intermediário colorido que serve como medida dos níveis de TBARS, indicando a ocorrência de peroxidação lipídica (ALMROTH et al., 2005).

O processo de LPO tem influência sobre a fluidez da membrana, bem como a integridade de biomoléculas associadas à membrana, como proteínas e colesterol.

Uma vez que esses lipídios, em peixes e outros organismos, estão justapostos à cadeia transportadora de elétrons, eles tornam-se alvos de radicais de oxigênio, que podem causar danos ao organismo. Os lipídios altamente oxidáveis, por sua vez, podem atacar proteínas próximas, formando um excesso de proteína carbonil (ALMROTH et al., 2005).

Em função dessa relação, muitas pesquisas vêm utilizando a LPO como marcador da indução do estresse oxidativo em peixes expostos a diferentes pesticidas (CRESTANI et al., 2007; MORAES et al., 2007; TONI et al., 2010, 2011; CATTANEO et al., 2011). No entanto, tem sido relatado que o efeito dos pesticidas nesses marcadores dependem do tecido, da espécie de peixe pesquisado, das condições de laboratório (a campo ou em laboratório), do tempo de exposição como também do agrotóxico a que os peixes foram expostos.

Pode ocorrer também a formação de grupos carbonil, pelo aumento de EROs que atuam sobre grupos amino das proteínas, alterando sua estrutura e função, formadas durante o estresse oxidativo (ALMROTH et al., 2005). Além disso, a carbonilação também pode ser formada através de mecanismos secundários, como resultado de reações dos radicais livres com outros constituintes celulares como lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (GRUNE, 2000).

Tendo em vista que a formação de derivados carbonílicos é irreversível, causando alterações conformacionais, diminuição da atividade catalítica de enzimas e, finalmente, resultando em degradação de proteínas por proteases, devido à maior suscetibilidade (ALMROTH et al., 2005), a investigação do conteúdo de proteína carbonil nas células é um biomarcador de estresse oxidativo muito utilizado em estudos humanos (PARVEZ; RAISUDDIN, 2005). Da mesma forma este parâmetro é utilizado por vários autores para verificar ocorrência de dano em proteínas em exposições agudas, subcrônicas ou crônicas; e também para investigar a influência das condições experimentais e as espécies de peixes expostas (PARVEZ; RAISUDDIN, 2005; TONI et al., 2011; MORAES et al., 2011; CATTANEO et al., 2011).

3.5.2 Sistema de Defesa Antioxidante

Os organismos aeróbios têm desenvolvido, através de processos evolutivos, mecanismos de defesas antioxidantes destinados a prevenir danos celulares provocados por espécies reativas (VALAVANIDIS et al., 2006). Para combater o estado de estresse oxidativo essas defesas constituem o sistema de defesa antioxidante que podem ser produzidas endogenamente ou serem adquiridas pela dieta.

O sistema de defesa antioxidante compreende um grupo de enzimas e vários antioxidantes de baixo peso molecular, como por exemplo, o ácido ascórbico, a glutathiona reduzida e outros tióis não-proteicos (WINSTON; DI GIULIO, 1991). As principais enzimas antioxidantes, que atuam no sentido de neutralizar EROs e combater o estresse oxidativo, são a superóxido dismutase, a catalase, a glutathiona redutase e a glutathiona peroxidase (ORUÇ; USTA, 2007; BALLESTEROS et al., 2009).

A enzima superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) constitui uma importante defesa antioxidante e pode ser encontrada tanto no citosol (CuZn-SOD) quanto no interior da mitocôndria (Mn-SOD). Essa enzima catalisa a transformação do radical superóxido, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (NORDBERG; ARNÉR, 2001; BARREIROS et al., 2006). Embora a atuação do ânion superóxido como oxidante direto seja irrelevante, uma vez que é pouco reativo e é eliminado pela SOD, ele pode auxiliar na produção do radical hidroxila, o mais deletério ao organismo, através da reação de Haber-Weiss (KEHRER, 2000).

A catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) está presente principalmente nos peroxissomos e atua na defesa contra o estresse oxidativo. Essa enzima promove a degradação do H_2O_2 em água e oxigênio molecular (ORUÇ; USTA, 2007; MODESTO; MARTINEZ, 2010). O H_2O_2 é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de atravessar as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila (BARREIROS et al., 2006). É por essa razão que a ação da CAT se faz imprescindível na defesa do organismo contra o estresse oxidativo. Alguns autores já relatam aumento na atividade da CAT

após exposição de peixes a diferentes pesticidas (ZHANG et al., 2004; PEIXOTO et al., 2006; MORAES et al., 2007, 2011). Toni et al. (2010) e Cattaneo et al. (2011), observaram uma inibição da atividade da enzima CAT no fígado de *Cyprinus carpio* expostas ao herbicida bispyribac-sodium e penoxsulam por 21 dias em lavoura de arroz.

A glutathione S-transferase (GST) (EC 2.5.1.18) é uma enzima que atua no processo de biotransformação, catalisando a conjugação de uma variedade de metabólitos, incluindo xenobióticos e produtos de lipoperoxidação com GSH, transformando o composto tóxico em uma forma facilmente excretável (MODESTO; MARTINEZ, 2010). Considerando sua função na detoxificação do organismo, um papel fundamental dessa enzima obviamente é a defesa contra o estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003). Moraes et al. (2011), observou uma inibição na atividade da GST em fígado de *Cyprinus carpio* em experimento realizado em lavoura de arroz por 30 e 90 dias expostas a uma formulação comercial contendo imazapic e imazethapyr. Além disso, Toni et al. (2010) e Cattaneo et al. (2011), também observaram uma diminuição da atividade da enzima GST no fígado de carpas expostas por 7 dias em condições de lavoura de arroz, aos herbicidas bispyribac-sodium e penoxsulam, respectivamente.

Entre os antioxidantes não-enzimáticos está o tripeptídeo glutathione em sua forma reduzida (GSH), que atua como o principal antioxidante na célula e como cofator para ação das enzimas GST e GPx (MARAN et al., 2009; MODESTO; MARTINEZ, 2010). Esse importante antioxidante ocorre naturalmente no organismo, prevenindo danos causados por radicais livres e auxiliando no processo de detoxificação, ligando-se a químicos. Durante um estresse oxidativo moderado, os níveis de GSH podem aumentar como uma resposta adaptativa, por meio de um aumento na sua síntese. Entretanto, um estresse oxidativo severo pode suprimir os níveis de GSH devido a uma falha nos mecanismos adaptativos (ZHANG et al., 2004). Além disso, a GSH é consumida por enzimas para detoxificar os peróxidos produzidos devido ao aumento da peroxidação lipídica (ALY et al., 2010).

O ácido ascórbico ou vitamina C, por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos, sendo comumente encontrado em sua forma ionizada – o ascorbato –, atuando como agente redutor no organismo. Assim, ele pode ser oxidado pela maioria das EROs que são formadas nos tecidos, convertendo-as em espécies inofensivas.

3.6 Parâmetros Metabólicos

A liberação de poluentes dentro do ambiente aquático pode refletir sobre os organismos presentes e desencadear mudanças em nível de parâmetros metabólicos. Muitas respostas bioquímicas e fisiológicas podem ocorrer quando um tóxico entra no organismo, como uma aclimação do organismo ou uma situação de toxicidade podendo afetar a sobrevivência dos animais (DE SMET; BLUST, 2001). Os peixes são uma importante fonte de alimento, são componentes importantes do ecossistema aquático e podem ser bons indicadores da toxicidade de poluentes porque suas respostas bioquímicas são similares às aquelas encontradas em mamíferos (GLUSCZAK et al., 2006). Portanto, as mudanças que ocorrem na atividade metabólica ou fisiológica de peixes expostos a diferentes poluentes ambientais, dentre eles os agrotóxicos, podem servir como bons indicadores secundários de toxicidade (JYOTHI; NARAYAN, 1999; BEGUM, 2004), ajudando a identificar os órgãos, alvos de toxicidade, e o estado geral de saúde do animal (ALMEIDA et al., 2001). Além disso, a avaliação de parâmetros metabólicos é importante por suas alterações surgirem antes dos sintomas clínicos, produzidos por substâncias tóxicas aparecerem em um organismo (RAO, 2006).

A dinâmica do metabolismo intermediário é fortemente influenciada por qualquer tipo de estresse, ou seja, qualquer tipo de mudança altera a homeostase do animal, levando a um conjunto de respostas. Essas, por sua vez, geralmente são adaptativas e ajudam o animal a lidar com as mudanças em seu ambiente. No entanto, às vezes, podem ocorrer algumas modificações nessa resposta ao estresse ou efeitos prejudiciais derivados dela podem ter sérias consequências sobre o organismo e, em última instância, sobre determinada população (SANCHO et al., 2000).

Na maioria das vezes, um estressor químico induz mudanças compensatórias no metabolismo energético dos organismos. Considerando que a maior parte da energia é usada para processos vitais como crescimento, reprodução e metabolismo basal, o aumento de energia despendida para lidar com o estresse poderá levar a uma redução nas reservas energéticas (SANCHO et al., 2009). Em uma situação de estresse, os organismos geralmente necessitam de uma demanda energética maior, a qual pode ser obtida através da quebra de

glicogênio hepático e muscular e aumento da glicose sanguínea. Dessa forma, as concentrações de glicogênio e glicose podem refletir o estado metabólico dos tecidos (CATTANI et al., 1996). Sob condições de hipóxia, o lactato é o produto final da glicólise, assim, a oxidação anaeróbia do substrato favorece o aumento da demanda energética em peixes (CRESTANI et al., 2006). Proteínas são os maiores constituintes no metabolismo dos animais, atuando na arquitetura e fisiologia da célula. Além disso, estão envolvidas na adaptação fisiológica do organismo a agentes tóxicos, os quais podem provocar mudanças no metabolismo dessas moléculas como estimulação da síntese ou da quebra (DE SMET; BLUST, 2001; CRESTANI et al., 2006).

O metabolismo de carboidratos que inclui o glicogênio, a glicose e lactato, são frequentemente alterados em tecidos de peixes expostos a agrotóxicos (CRESTANI et al., 2006; GLUSCZAK et al., 2006, 2007). O metabolismo de proteínas, também é muito importante, uma vez que após exposição a contaminantes ambientais pode ocorrer tanto o catabolismo proteico, quanto a síntese de proteínas e ainda alterações nos níveis de amônia e aminoácidos. FERNÁNDEZ-VEGA et al. (2002) observaram uma hipoproteinemia em músculo e brânquias de *Anguilla anguilla* expostos a um herbicida da classe dos carbamatos. Ao contrário, FONSECA et al. (2008) encontraram níveis de proteínas aumentados em músculo de piavas (*Leporinus obtusidens*) após exposição ao herbicida 2,4-D. Outra resposta fisiológica que pode ocorrer é o aumento dos níveis de amônia em fígado e músculo de peixes expostos a herbicidas (BEGUM, 2004; GLUSCZAK et al., 2006, 2007).

O sistema metabólico do peixe é bastante semelhante ao dos mamíferos, porém com uma grande diferença na quantidade de musculatura branca, que é maior em peixes. Devido a isso, o metabolismo anaeróbico é bastante utilizado pelos peixes em caso de estresse fisiológico intenso, onde a obtenção de energia precisa ser obtida rapidamente. Diversos autores já reportaram alterações nos níveis de lactato hepático, muscular e plasmático (CRESTANI et al., 2006; GLUSCZAK et al., 2006; CATTANEO et al., 2008). A hiperglicemia é um indicador secundário de estresse, frequentemente reportada em estudos que avaliam o plasma de peixes expostos a agrotóxicos (ORUÇ; UNER, 1999; AGUIAR et al., 2004; CRESTANI et al., 2006; FONSECA et al., 2008; CATTANEO et al., 2008).

3.7 Parâmetros Genotóxicos

Como muitos dos xenobióticos são mutagênicos/carcinogênicos, testes de mutagenicidade são também aplicados à toxicologia aquática (SCARPATO et al., 1990). Vários biomarcadores de genotoxicidade incluindo o ensaio cometa (CHEUNG et al., 2007; SHARMA et al., 2007) e o teste do micronúcleo (PAVLICA et al., 2000; NIGRO et al., 2006) são amplamente medidos em ecotoxicologia como marcadores moleculares tóxicos dos principais poluentes ambientais (WESSEL et al., 2007).

O ensaio cometa é um teste sensível, rápido e econômico, além de exigir apenas poucas células para a sua execução (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; TICE et al., 2000). Assim, segundo diversos autores (BANU et al., 2001; ATTEQ et al., 2005; DEGUCHI et al., 2007; VENTURA et al., 2008), o teste do cometa tem sido aplicado com sucesso em eritrócitos de muitas espécies de peixes expostos a diferentes agentes genotóxicos, já que a reação permite avaliar a potencialidade de quebras de DNA nestes organismos, devido à ação de diferentes xenobióticos. Além disso, esse ensaio é favorecido, entre outros métodos citogenéticos (aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e teste do micronúcleo) utilizados para a detecção de danos no DNA (BUSCHINI et al., 2003), pois é capaz de detectar uma grande variedade de danos ao DNA como quebras de DNA de fita simples (SHARBEL, 2004). Essas quebras no DNA podem ser consideradas lesões potencialmente pré-mutagênicas (KAMMAN et al., 2001). Assim esses danos ao DNA estão relacionados com as possíveis propriedades mutagênicas e genotóxicas dos pesticidas (FRENZILLI et al., 2000). Os quais podem causar rupturas na fita simples do DNA ou dos filamentos duplos de DNA ou ainda formação de ligações cruzadas de proteínas com o DNA (FAIRBRAIRN et al., 1995). Nwani et al. (2010), aplicaram o ensaio cometa para avaliar rupturas dos filamentos de DNA em eritrócitos e células branquiais de *C. punctatus* expostos por 96 horas ao inseticida carbosulfan e observaram danos no DNA, bastante significativas nos dois tecidos testados.

Além disso, os contaminantes ambientais interferem nos sistemas antioxidantes defensivos, causando danos em organismos aquáticos pela produção de EROs (RISSO-DE FACERNEY et al., 2001; LIU et al., 2006). Em vista disso,

alguns autores (PEÑA-LLOPIS et al., 2003; BANUDEVI et al., 2006) relatam que as EROs tais como, o peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila em níveis altos em humanos produzem danos como quebras de DNA, inativação enzimática e até mesmo a apoptose celular. Nessa cascata, a GSH e as enzimas glutaciona-dependentes são as principais enzimas na eliminação de substâncias tóxicas formadas durante bioativação do xenobióticos. Então, a depleção de GSH celular abaixo do nível crítico impede a conjugação de xenobióticos para GSH e lhes permite combinar-se covalentemente com o DNA, RNA ou proteínas celulares e, assim levar a danos celulares (MEISTER; ANDERSEN, 1983). Os danos ao DNA também podem ser devido à formação de conjugados de GSH, os quais podem esgotar o conteúdo celular de GSH e conseqüentemente induzir a ocorrência de estresse oxidativo (YAMANO; MORITA, 1995).

Contudo, as propriedades genotóxicas dos pesticidas dependem da estrutura química dos compostos, do tipo de células atingidas, que possuem níveis de DNA diferenciados devido à variação na atividade de reparo do DNA, da atividade metabólica e das concentrações de antioxidantes (LEE; STEINERT, 2003; XIÃO et al., 2008; NWANI et al., 2010). Isso é confirmado por estudos que mostram que diferentes espécies de peixes indicam uma maior sensibilidade das células das brânquias ao dano ao DNA do que os eritrócitos, linfócitos, fígado ou células do rim (ATEEQ et al., 2005; PANDEY et al., 2006; SHARMA et al., 2007; ALI et al., 2008, 2009; NWANI et al., 2010).

Tendo em vista que os peixes possuem um grande número de hemácias nucleadas o que favorece o teste do micronúcleo (ATEEQ et al., 2002), Ventura et al. (2008) afirma que, o teste do MN em eritrócitos de peixes tem sido utilizado como uma das primeiras medidas na avaliação do potencial clastogênico (que quebram cromossomos) de uma substância no ambiente. Além disso, vários estudos têm demonstrado que os eritrócitos de peixes apresentam uma alta incidência de formar micronúcleos, depois da exposição a diferentes poluentes, tanto em condições de campo quanto de laboratório (BOMBAIL et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2006; VENTURA et al., 2008). Segundo, Ferraro et al. (2004) e Çavas et al. (2005), são considerados micronúcleos: núcleos pequenos, não-refratáveis, massas intracitoplasmáticas de cromatina circular ou ovóide resultantes da quebras cromossômicas após a ação clastogênica, em que os cromossomos não migram durante a anáfase. Atualmente muitos pesticidas já foram relatados por induzirem a

formação de micronúcleos em animais (CHAUHAN et al., 2000; GIRI et al., 2002). Nwani et al. 2010, demonstraram que a exposição de *Channa punctatus* ao inseticida causa carbosulfan uma maior frequência de MN nos eritrócitos dos peixes e que esse aumento foi mais acentuado quando a concentração e a duração da exposição foi maior. Da mesma forma Abdul Farah et al. (2003) observaram esses efeitos em seus estudos com *C.punctatus* expostos ao 2,4-D. Çavas e Ergene-Gözükara et al. (2005) mostram em seus estudos com *Oreochromis niloticus* expostos ao petróleo refinado e cromo, que a frequência da ocorrência do MN sofre variações teciduais específicas, mostrando que as células das brânquias exibem MN maiores do que os eritrócitos.

4 RESULTADOS

4.1 Manuscrito I

Effects of herbicide clomazone in carp (*Cyprinus carpio*)

Roberta Cattaneo, Daiane Ferreira, Barbara Clasen, Charlene Carvalho de Menezes, Denise Miron, Bernardo Baldisserotto, Vania Lucia Loro.

Submetido a Revista: Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

Effects of herbicide clomazone in carp (*Cyprinus carpio*)

Cattaneo, R^a., Ferreira, D^a., Clasen, B^a., Menezes, C.C.^a, Miron, D.^a, Baldisserotto, B^b., Loro, V.L.^{a*}

^aLaboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding Author:

*Dr^a Vania Lucia Loro

Laboratório de Toxicologia de pesticidas em peixes

Departamento de Química - Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

97105-900 Santa Maria RS

Brazil

Phone: + 55 55 3220-9456

Abstract

Carp were exposed to 10, 20, 30, 40, 50mg/L of the herbicide clomazone for 96h. Fish exposed to 20, 30, 40 and 50mg/L, showed behavioral changes and the LC₅₀-96h was 30.35mg/L. The acetylcholinesterase activity showed no significant changes in the brain of the fish that died in any of the tested concentrations (30, 40 and 50mg/L). Different, an increase in the muscle AChE activity observed in the group exposed to 50mg/L. AChE activity significantly decreased in the brain of the fish that remained alive after 96h of exposure to 10, 20 and 30mg/L and in the muscle of those maintained at all concentrations.

KeyWords: Carp, clomazone, AChE, CL₅₀-96h.

1. Introduction

Due to the intensification of agricultural practices, the use of pesticides has been intensified to control pests that damage the crops, especially rice (Kreutz et al., 2008). Recently, a great number of studies considering changes induced by environmental contamination in aquatic organisms were published (Sancho et al., 2000; Lionetto et al., 2003; Sayeed et al., 2003; Moraes et al. 2007). Clomazone (isoxazolidinone) is widely used in agriculture, especially in paddy rice fields in southern Brazil, with activity against Poaceae (Jonsson et al., 1998). This herbicide is highly effective but may cause contamination of surface and groundwater due to its high water solubility (1100 mg/L) and its half-life dissipation, with an average of 28-84 days (Zanella et al., 2002). It has been reported that the contamination of surface waters in southern Brazil and the concentrations of herbicides used in agriculture affect metabolic parameters and oxidative stress in different fish species (Crestani et al., 2006; Moraes et al., 2007; Silva et al., 2009). The clomazone concentration generally recommended in rice fields is 0.4 to 0.7 mg/L (Rodrigues and Almeida, 2005). This herbicide can reach rivers, lakes, streams, and water springs through the constant leakage of water from these crops in times of planting and harvesting or even leaching during periods of rain (Van Der Oost et al., 2003). Effects of

commercial formulations containing the herbicide clomazone on common carp are scarcely studied.

Assays of acetylcholinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) as a biomarker in different tissues provide sensible methods for detecting water contamination by many pesticides or herbicides (Sancho et al., 2000). Herbicides can cause changes in enzyme activity, either inhibition or activation (Moraes et al., 2007, 2011). AChE is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) into choline and acetate in the synaptic cleft. When the inhibition of AChE activity occurs, ACh increases at these places leading to a disorder of the brain and muscle tissue (Roex et al., 2003). The inhibition of AChE activity could affect the growth, survival, feeding, and reproductive behavior of fish exposed to different pollutants (Dutta and Arends, 2003).

Common carp, *Cyprinus carpio*, a native fish of Eastern Europe and Western Asia and widely raised in southern Brazil (Baldisserotto, 2009), is an omnivorous species that feeds on invertebrates, plants, algae, consume insects larvae and crustaceans and can also feed on small fish (Querol et al., 2005). In this study, it was investigated the acute toxicity of the herbicide clomazone, which is commonly used in rice fields. Thus, the objective of this study was to determine the lethal concentration (LC₅₀-96h) of clomazone, analyze the behavior of fish during 96 hours of exposure and also to detect changes in AChE activity in common carp exposed to this herbicide.

2. Materials and Methods

2.1 Fish

Common carp fingerlings (8.3 ± 0.5 g and 10.0 ± 0.8 cm) were obtained from a fish farm (RS, Brazil). Fish were acclimated to laboratory conditions during 10 days, in tanks (250 L) prior to the experiments. They were kept in continuously aerated water with a static system and with a natural photoperiod (12-h light/12-h dark). In the period of acclimation, the fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil) in the proportion of 1% of the total biomass up to 24 hours prior to and during testing as Phyu et al. (2006). This study and experiments

were approved by the board on experimentation on animals of the Federal University of Santa Maria. Reference number: 23081.007491/2010-42.

2.2 Chemicals

The herbicide clomazone (2-(2-chlorophenyl) methyl-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone) used in this study was obtained commercially from the FMC Corporation (Gamit[®], 50% purity, Philadelphia, EUA) and dissolved in water. Acetylthiocholine (ASCh), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), dinitrofenylhydrazine (DNPH), bovine serum albumin, Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3 Experimental design

2.3.1 Exposures

After acclimation, fish were transferred to continuously aerated 45 L boxes (groups of 6 fish per box, all exposures were performed in triplicate) and exposed for 96 hours to the following clomazone nominal concentrations: 10, 20, 30, 40 and 50 mg/L. A control group was maintained in the same conditions, but without the herbicide. Herbicide was added to the water only at the beginning of the experiment. An acrylic wool filter was used in each box to remove feeding waste. These filters were cleaned every day. Water quality did not change throughout the experimental period, as described in the Table 1. Herbicide was analyzed in by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) using the method described by Zanella et al. (2002) and average the results are reported in Table 2.

2.3.2 Behavior parameters

Mortality from each concentration of herbicide was recorded for estimation of LC₅₀ (Fig. 1) The safety index was estimated by dividing the LC₅₀-96h by the maximum clomazone concentration needed for the manufacturer in the crop, which is 0.7 mg/L (Rodrigues and Almeida, 2005). Swimming activity (normal, erratic swimming, lethargy, position in the water column) and responses to mechanical

stimulus (tapping on the boxes wall) were observed twice a day for 15 minutes, on all days of the experiment. Dead fish were removed from the boxes to collect muscle and brain. These tissues were also sampled from surviving fish at the end of the experiment (96 hours). Tissues were frozen at -21°C until further determinations.

2.3.3 AChE activity assay

The AChE (EC 3.1.1.7) activity was measured using the method described by Ellman et al. (1961) and modified by Miron et al. (2005). Brain and muscle tissues (30 mg) were weighted and homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with sodium phosphate buffer 50 mM pH=7.2 and Triton X-100 1%. The homogenate was then centrifuged for 10 minutes at $3.000 \times g$ at 5°C and the supernatant was used as enzyme source. Aliquots of supernatant (50 and 100 μL) (brain and muscle, respectively) were incubated at 30°C for two minutes with a solution containing 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.5 and 1 mM DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)). After the incubation period, the reaction was initiated by the addition of 0.5 mM acetylcholine (ASCh). The final volume was 2.0 mL. Absorbance was measured by spectrophotometry (Femto Scan spectrophotometer) at 412 nm during 2 min. Enzyme activity was expressed as μmol of ASCh hydrolyzed/min/mg protein.

2.4.2 Protein determination

Protein was determined by the Comassie blue method using bovine serum albumin as standard. Absorbance of samples was measured at 595 nm (Bradford et al., 1976).

2.5 Statistical procedures

The mean concentrations quantified by HPLC for the 96 hours of exposure (Table 2) were used for the calculus of toxicity values. The mean LC_{50} for 96 hours was calculated using probit analysis as described by Finney (1971). The AChE activity data were analyzed using by Student t-test (parametric determinations) and

expressed as mean±standard deviation. Value of $P \leq 0.05$ was considered statistically significant for all statistical analyses between treatments and controls.

3. Results and Discussion

The mean LC₅₀-96h of clomazone for common carp exposed in this experiment is 30.35 mg/L (confidence interval 23.00–37.00 mg/L) and the safety index is 43.36. By comparing these results with the findings of the literature dealing with the same herbicide observed that carp when exposed to the herbicide clomazone have a similar resistance to bluegill sunfish *Lepomis macrochirus* (34 mg/L) (Vencil et al., 2002) and *Hyphessobrycon scholze* (27.3 mg/L) (Jonsson et al. 1998). However, this the LC₅₀-96h of clomazone for *Cyprinus carpio* found in this study also was greater than found for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and silver catfish (*Rhamdia quelen*) which were 19 mg/L and 7.32 mg/L of clomazone, respectively (Vencil et al., 2002; Miron et al., 2005), showing a higher resistance of carp against exposure to clomazone.

Futhermore, the LC₅₀-96h value determined for common carp in this study is above the value found by Resgalla Jr et al., (2002) for the same species which was 9.76 mg/L of clomazone (19,52 mL/L of Gamit[®] 50%) and a safety index of 13,94). These disparate results were probably due to differences in experimental conditions, as used in this study were 45 L boxes with 6 fish per box, which differed from the study Resgalla et al. (2002), which was in boxes with 10 fish per 3 L box, showing that the toxicity of a pesticide on a organism can vary not only by species of fish as well as analyzed by the experimental conditions.

The LC₅₀-96h value found for clomazone and the lowest concentration tested that did not kill any common carp exposed (20 mg/L) in this study are much higher than the concentrations of this herbicide used in the rice field (0.4 to 0.7 mg/L) (Rodrigues and Almeida, 2005), demonstrating that there is a good safety margin of use for this herbicide in the field, but inhibited AChE. The clomazone values found in southern Brazil rivers near rice fields crop were between 0.001 and 0.04 µg/L (Marchezan et al., 2007; Silva et al., 2009). Fish exposed to 10 mg/L clomazone did not present relevant behavioral changes when compared to control fish. However, most common carps exposed to higher levels showed lethargy, erratic swimming,

swam always on the water surface, abdominal swelling, and impaired response to stimuli (data not shown). The observed erratic swimming was also found in silver catfish exposed to this herbicide for the same period (Miron et al., 2005).

The inhibition or activation of AChE can affect the process of cholinergic neurotransmission and promote undesirable effects in fish (Moraes et al., 2007). The increased activity observed in the muscle of dead fish (260.1%) exposed to 50 mg/L of clomazone, could be responsible by acetylcholine depletion in the synaptic cleft (Fig. 2A). At best our knowledge the activation effects did not have a valid hypothesis for changes observed in this enzyme. However, it is important note that the observation of fish behavior was performed only twice a day and we do not know the exact time of death or dying fish. An increase of AChE activity was also observed in the muscle of fish that survived the exposure to 10, 20 and 30 mg/L clomazone (143.7, 137.1 and 138.4%, respectively). This result is consistent with the increased muscle AChE activity in *Leporinus obtusidens* exposed to 0.5 mg/L clomazone (Moraes et al., 2007). However, the activity of AChE in the brain was inhibited by all concentrations of clomazone in surviving fish (Fig. 2B), being that the decrease induced by 10, 20 and 30 mg/L of clomazone was 44.3, 42.7 and 35.5%, respectively. The inhibition of AChE enzyme activity is fairly reported. For example, in both muscle and brain of silver catfish exposed to 5, 10 and 20 mg/L clomazone for 96 hours and the fish were hyperactive during the experiment (Miron et al., 2008). In addition, there was 47% and 45% inhibition in the brain and muscle AChE activity of silver catfish after 12 h exposure to 0.5 and 1.0 mg/L clomazone (Crestani et al., 2007). In spite of presenting changes in the swimming activity, common carps exposed to 30 mg/L clomazone did not show any significant change on muscle and brain AChE activity after death (Fig. 2A). The LC_{50-96h} and the high safety index show that common carp had a significant resistance to clomazone exposure, and clomazone field concentration do not affect carps, already found that the LC_{50-96h} is n times the concentrations used in rice crop. In addition, AChE activity can be considered a biomarker of exposure to this herbicide.

References

- Baldisserotto B (2009) Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Cienc Rural* 39:291- 299
- 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
- Crestani M, Menezes C, Gluszczak L, Miron DS, Lazzari R, Duarte MF, Morsch VM, Pippi AL, Vieira VP (2006) Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol Environ Saf* 65:48- 55
- Crestani M, Menezes C, Gluszczak L, Miron SD, Spanevello R, Silveira A, Gonçalves FF, Zanella R, Loro VL (2007) Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67:2305-2311
- 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 JV (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95
- Finney DJ (1971) Probit Analysis. Cambridge University Press: Cambridge pp. 144.
- Jonsson CM, Maia AHN, Ferreira CJ, Ribeiro EO (1998) Risk assessment of the herbicide clomazone to aquatic life. *Verh Int Verein Limnol* 26:1724–1726
- Kreutz LC, Barcellos LJG, Silva TO, Anzillero D, Martins D, Lorenson M., Marteninghe A, Silva LB (2008) Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Cienc Rural* 38:1050-1055
- 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
- Miron DS, Crestani M, Shettinger MR, Morsch VM, Baldisserotto B, Tierno MA, Moraes G, Vieira VLP (2005) Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol Environ Saf* 61:398–403

- Miron DS, Pretto A, Crestani M, Gluszczak L, Shettinger MR, Loro VL, Morsch VM (2008) Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74:1-5
- Marchesan E, Zanella R, Avila LA, Camargo ER, Machado SLO, Macedo VRM (2007) Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Sci Agric* 64:176-180
- Moraes BS, Loro VL, Gluszczak L, Pretto A, Menezes C, Marchezan E, Machado SO (2007) Effect of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 68:1597-1601
- Moraes BS, Clasen B, Loro VL, Pretto A, Toni C, Avila LA, Marchesan E, Machado SLO, Zanella R, Reimche GB (2011) Toxicological responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:328-335
- Phyu YL, Warne MStJ, Lima RP (2006). Toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to the freshwater fish (*Melanotenia fluviatilis*) under laboratory and simulated field conditions. *Sci Total Environ* 356:86– 99
- Querol MVM, Querol E, Pessano EFC, Azevedo CLO (2005) Ocorrência da Carpa Húngara, *Cyprinus carpio* (LINNAEUS, 1758) e disseminação parasitária, no Arroio Felizardo, Bacia do Médio Rio Uruguai, RS, Brasil. *Biodiversidade Pampeana, PUCRS, Uruguiana* 3:21-23
- Resgalla JrC, Noldin JA, Santos AL, Sato G, Eberhardt DS (2002) Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). *Pest Ecotox Meio Amb* 12:59-68
- Rodrigues BN, Almeida FS (2005) Guide to herbicide, 5th Ed. 705 IAPAR, Londrina, pp 461–466
- Roex EWM, Keijzers R, Van Gestel CAM (2003) Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquat Toxicol* 64: 451-460
- Sancho E, Fernández-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
- 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

- Silva DRO, Avila LA, Agostinetto D, Magro TD, Oliveira E, Zanella R, Noldin JA (2009) Pesticides monitoring in surface water of rice production areas in southern Brazil. *Cienc Rural* 39:2383-2389
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149
- Vencil WK, Armbrust K, Hancock HG (2002) *Herbicide Handbook*, eighth ed. Weed Sci. Society of America, Lawrence pp. 103–107
- 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. *Chromatographia* 55:573-577

Figure captions

Figure 1: Carp mortality after exposure to commercial herbicide containing clomazone for 96 hours.

Figure 2: AChE activity in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone for 96 hours. Muscle and brain of dead (A) and alive (B) fish at the collect moment. Data represent the mean \pm SD.

*Indicate significant difference from control values ($P \leq 0.05$).

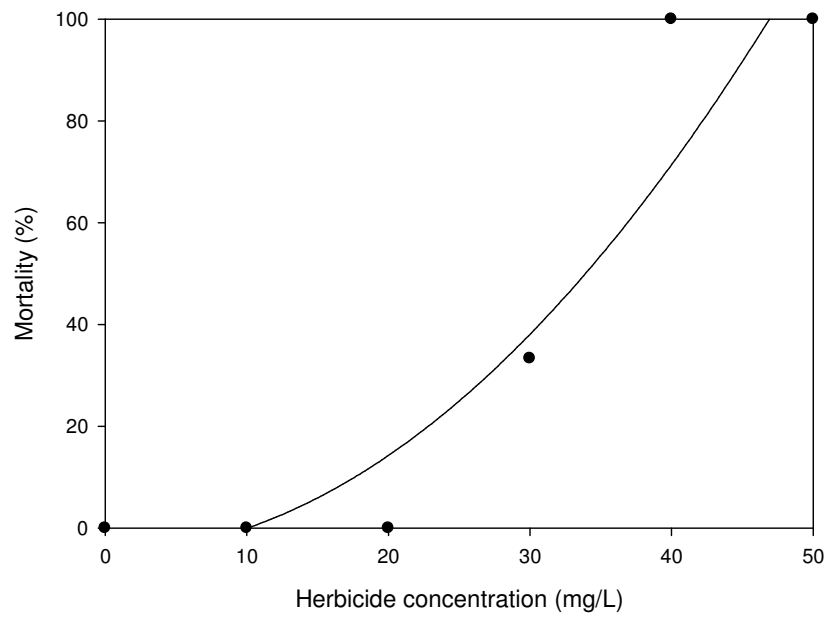


Figure 1: Carp mortality after exposure to commercial herbicide containing clomazone for 96 hours.

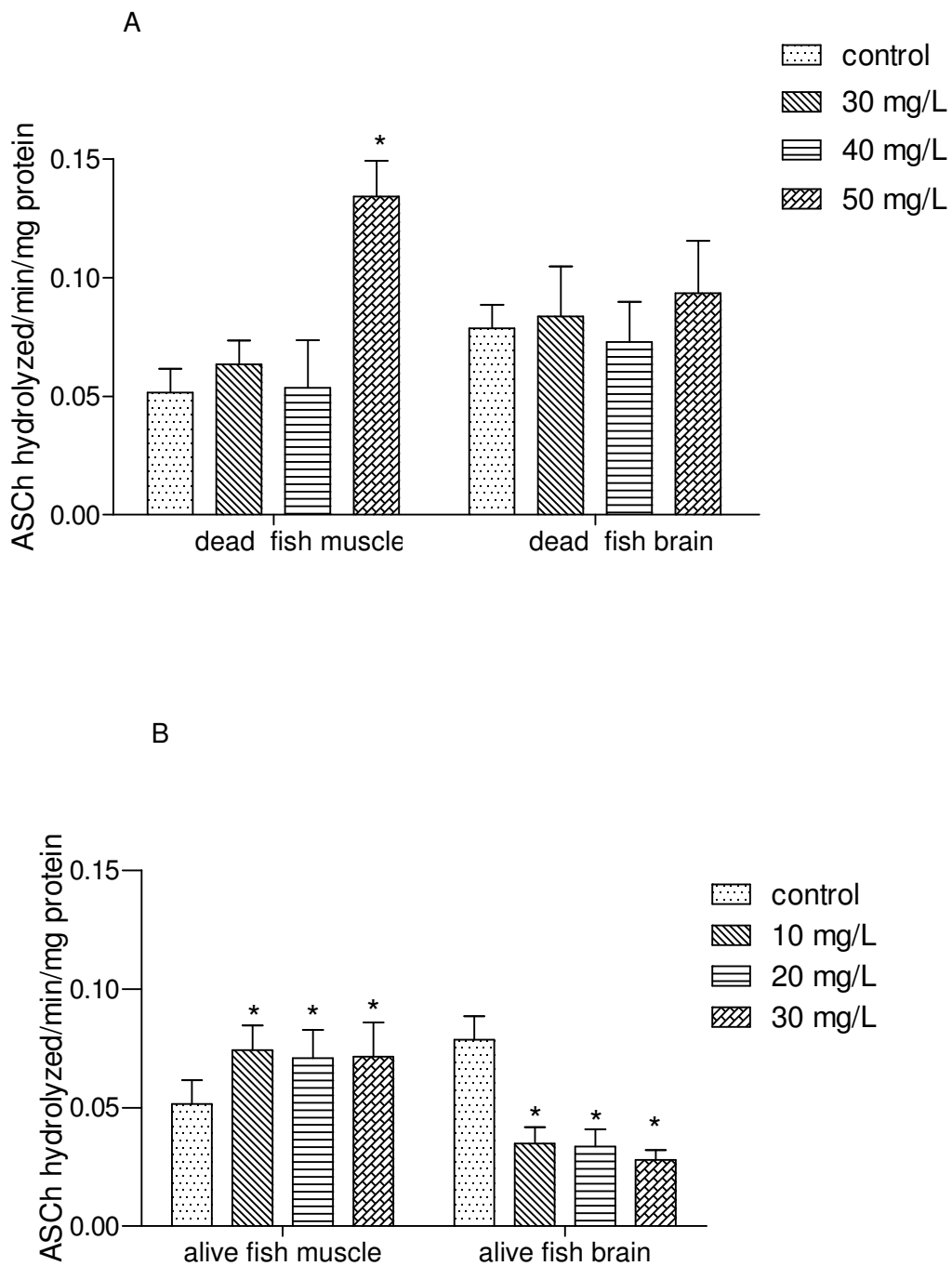


Figure 2: AChE activity in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone for 96 hours. Muscle and brain of dead (A) and alive (B) fish at the collect moment. Data represent the mean \pm SD. *Indicate significant difference from control values ($P \leq 0.05$).

Table 1. Water quality parameters through the experiment.

Clomazone Concentration (mg/L)	pH	Dissolved oxygen (mg/L)	Temperature (°C)	Nitrite (mg/L)	Total ammonia (mg/L)
0	8.12±0.01	9.20±0.03	24.0±0.1	0.01±0.00	0.02±0.01
10	8.15±0.00	8.33±0.02	23.7±0.0	0.04±0.01	0.02±0.00
20	8.14±0.06	9.13±0.01	23.0±0.2	0.03±0.01	0.07±0.03
30	8.15±0.02	9.32±0.04	23.0±0.1	0.02±0.00	0.02±0.00
40	8.10±0.03	10.60±0.02	23.5±0.0	0.06±0.02	0.03±0.01
50	8.05±0.01	9.50±0.01	22.0±0.1	0.05±0.03	0.02±0.01

n=3 for each tank; values are expressed as mean ± SD

Table 2. Nominal and average measured concentrations of clomazone during the experiment.

Nominal Concentrations (mg/L)	Average Measured Concentrations (mg/L)
10	10.72±0.01
20	21.33±0.03
30	31.31±0.04
40	41.57±0.07
50	46.34±0.05

n=3 for each tank; values are expressed as mean ± SD

4.2 Artigo I

Tissue Biochemical Alterations of *Cyprinus carpio* Exposed to Commercial Herbicide Containing Clomazone Under Rice-field conditions

Roberta Cattaneo, Bibiana Silveira Moraes, Vania Lucia Loro, Alexandra Pretto, Charlene Menezes, Gerson Meneghetti Sarzi Sartori, Bárbara Clasen, Luis Antonio de Avila, Enio Marchesan, Renato Zanella

Aceito pela revista: Archives of Environmental Contamination and Toxicology

DOI: 10.1007/s00244-011-9669-8

Tissue Biochemical Alterations of *Cyprinus carpio* Exposed to Commercial Herbicide Containing Clomazone Under Rice-Field Conditions

Roberta Cattaneo · Bibiana Silveira Moraes · Vania Lucia Loro ·
Alexandra Pretto · Charlene Menezes · Gerson Meneghetti Sarzi Sartori ·
Bárbara Clasen · Luis Antonio de Avila · Enio Marchesan · Renato Zanella

Received: 13 September 2010 / Accepted: 28 March 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Field and laboratory experiments were performed to evaluate toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to the commercial herbicide clomazone (500 mg l⁻¹). Fish were exposed to 0.5 mg l⁻¹ of the formulated herbicide for 7, 30, and 90 days. Fish were exposed to clomazone in field conditions (7, 30, or 90 days trapped in submersed cages together with rice crops) and in laboratory conditions where the fish were placed in 45-l tanks with tap water only for 7 days. Fish exposed for 7, 30, or 90 days showed no alterations in acetylcholinesterase (AChE) activity under field conditions. Under laboratory conditions, decreased muscle AChE activity was observed only after 7 days of exposure. During the same evaluation period (7 days), oxidative stress parameters changed under both field and laboratory conditions; however, metabolic parameters were altered only under field conditions. Disorders in oxidative stress parameters and metabolism were evident in different tissues up to day 90 after treatment. These overall results show that AChE activity changed only under laboratory conditions.

Oxidative stress, along with metabolic parameters, may be good indicators of herbicide contamination in *C. carpio* under rice-field conditions.

Several environmental pollutants can cause alterations in the biochemical parameters of nontarget organisms. Among these pollutants, pesticides are one of the chemicals known to affect fish by increasing the intracellular formation of reactive oxygen species (ROS). When an imbalance between ROS and the antioxidant system occurs, cells may develop oxidative stress (Nordberg and Arnér 2001). Oxidative stress can also occur as damage to biological systems or failure of antioxidant defense systems. For instance, hydroxyl radical (OH[·]), which is a product of reactions with free radicals, reacts quickly with nearby molecules, leading to oxidative changes in proteins, lipids, and nucleic acid (Cardoso et al. 2006). Lipid peroxidation (LPO) and carbonylation of proteins have both been used to assess the effect of pollutants in aquatic organisms. Different studies have shown that when these parameters are increased, fish are under oxidative stress (Parvez et al. 2006; Almroth et al. 2008). Antioxidant and detoxificant systems in fish include enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, and glutathione *S*-transferase (GST). Increased activity of these enzymes can indicate disorders that could be indicative of redox alterations related to a possible oxidative stress situation. CAT and GST enzymes have been used as parameters to assess environmental pollutant contamination in fish tissues (Moraes et al. 2007).

Another enzyme that has been used to assess exposure of several contaminants is acetylcholinesterase (AChE). AChE is a key enzyme in cholinergic transmission in the nervous system. The broad function of this enzyme is to

R. Cattaneo · B. S. Moraes · V. L. Loro · A. Pretto ·
C. Menezes · B. Clasen
Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de
Química, Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, RS, Brazil

G. M. S. Sartori · L. A. de Avila (✉) · E. Marchesan
Departamento de Fitossanidade, UFPEl, Pelotas, RS, Brazil
e-mail: laavilabr@gmail.com

R. Zanella
Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas,
UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

Abstract

Field and laboratory experiments were carried out to evaluate toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to the commercial herbicide clomazone (500 mg L^{-1}). Fish were exposed to 0.5 mg L^{-1} of the formulated herbicide for 7, 30, and 90 days. Fish were exposed to clomazone in field conditions (7-90 days), trapped in submersed cages together with rice crop and in laboratory conditions where the fish were disposed in tanks of 45 L with tap water only for 7 days. Fish exposed to 7, 30 or 90 days showed no alterations in the acetylcholinesterase (AChE) activity under field conditions. Under laboratory conditions a decrease in the muscle AChE activity was observed only after 7 days of exposure. During the same evaluation period (7 days), oxidative stress parameters changed under both field and laboratory conditions; however, the metabolic parameters were altered only under field conditions. Disorders in the oxidative stress parameters and metabolism were evident in different tissues up to day 90 after treatment. These overall results show that the AChE activity changed only under laboratory conditions. Oxidative stress along with metabolic parameters may be good indicators of herbicide contamination in *C. carpio* under rice field conditions.

Keywords: *Cyprinus carpio*, oxidative stress, AChE, metabolism, herbicide.

Introduction

Several environmental pollutants can cause alterations in biochemical parameters of non-target organisms. Among these pollutants, pesticides are one of the chemicals known to affect fish enhancing the intracellular formation of reactive oxygen species (ROS). When an imbalance between ROS and the antioxidant system occurs, the cell may develop oxidative stress (Nordberg and Arnér, 2001). Oxidative stress can also be represented by some damage in biological systems or failure in the antioxidant defense system. For instance, hydroxyl radical (OH^{\bullet}), which is a product of reactions with free radicals, reacts quickly with nearby molecules, leading to oxidative changes in proteins, lipids, and nucleic acid (Cardoso et al. 2006). Lipid peroxidation (LPO) and carbonylation of proteins have been used to assess the effect of pollutants in aquatic organisms. Different studies have shown that when these parameters are enhanced, fish are under oxidative stress (Parvez et al., 2006; Almroth et al., 2008). The antioxidant and detoxificant systems in fish

include enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and the glutathione S-transferase (GST). An increase in the activity of such enzymes can indicate disorders that could be indicative of redox alterations related to a possible oxidative stress situation. CAT and GST enzymes have been used as parameters to assess environmental pollutant contamination in fish tissues (Moraes et al., 2007).

Another enzyme that has been used to assess exposure of several contaminants is the acetylcholinesterase (AChE). AChE is a key enzyme in the cholinergic transmission in the nervous system. The wide function of this enzyme is to catalyze the hydrolysis of acetylcholine into acetate and choline in the synaptic cleft (Yi et al., 2006). Herbicides can cause inhibition or activation of the activity of this enzyme; however, the effects of the activation are little known. Different herbicides classes such as isooxazolidinone (clomazone), dichloropropionanilide (propanil) and sulfonyleurea (metsulfuron-methyl) have shown enhancement muscle AChE activity in *Cyprinus carpio* exposed for 30 days (Moraes et al., 2007). Miron et al. (2005) found brain AChE activity increased in *Rhamdia quelen* exposed to quinclorac herbicide (quinolines group). The most important effect reported for AChE activity is the inhibition; in this line, some herbicides such as glyphosate (Gluszczak et al., 2006) and propanil cause AChE inhibition in tissues of *Leporinus obtusidens* (Moraes et al., 2009). Herbicides clomazone and glyphosate can also cause disorders in carbohydrate, protein metabolism, and blood parameters (Crestani et al., 2006; Gluszczak et al., 2007). These parameters are secondary indicators of stress. Thus, when they are assessed along with other parameters we can obtain a good picture of fish poisoning by pesticides.

Cyprinus carpio (Cyprinidae) was chosen for this study because the effect of clomazone on fish species, particularly on this one, has been scarcely studied. Another important aspect is that this species is commercially relevant for fisheries in Southern Brazil. This species is very resistant and adaptable to different temperatures, and it is frequently used in association with rice crop (Castagnolli and Cyrino, 1986).

Clomazone {2-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone} is a widely used herbicide for weed control in rice in the state of Rio Grande do Sul (RS) in Southern Brazil. It has high water solubility (1100 mg L⁻¹) and its half-life in soil is 24 days (Senseman, 2007). The field dissipation half life of clomazone determined

with several types of soil ranged from 4 to 12 weeks (Zanella et al., 2002). Concerning environmental levels clomazone residues (0.31-1.72 µg/L) were detected in 90% of water samples taken from rivers of rice producing regions (Zanella et al., 2002). This herbicide has been reported for contaminating surface water in RS (Marchezan et al. 2007), and has also been reported to affect different fish species (Miron et al., 2005; Crestani et al., 2006; Moraes et al., 2011). The concentration used in the present study was chosen according to recommended use for rice crop.

The evaluation of herbicide effects in fish cultivated in association with rice has been scarcely studied and needs better understanding to establish pesticide safe levels to fish health. Thus, the present study aimed to investigate the effects of the commercial formulation of rice herbicide containing clomazone on *Cyprinus carpio* in concentrations used in rice fields as well as to determine the possible indicators of fish exposure to this herbicide.

Materials and Methods

Fish

Cyprinus carpio of both genders weighting 20.0 ± 1.0 g and measuring 11.0 ± 1.0 cm length were obtained from a fish farm (RS, Brazil). Fish were acclimated to laboratory conditions for 10 days in tanks (250 L) prior to the experiments. They were kept in continuously aerated water with a static system and with a natural photoperiod (12h light/12h dark). After this period, fish were divided in two groups. One group was transferred to rice paddy and the other was transferred to a laboratory tank. Fish were exposed to rice paddy condition for 7, 30 and 90 days and to laboratory conditions for 7 days. The rice paddy water, during experimental period (90 days) had the following average parameters: temperature 24.5 ± 2.0 °C, pH 6.5 ± 0.2 units, dissolved oxygen 4.21 ± 2.0 mg L⁻¹, nonionized ammonia 0.8 ± 0.01 µg L⁻¹, nitrite 0.06 ± 0.01 mg L⁻¹. Under laboratory conditions the average of water parameters were: temperature 22.1 ± 1.0 °C, pH 7.7 ± 0.2 units, dissolved oxygen 7.3 ± 1.0 mg L⁻¹, nonionized ammonia 0.3 ± 0.01 µg L⁻¹, nitrite 0.04 ± 0.01 mg L⁻¹. Fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil) both during acclimation and exposure period.

Chemicals

A commercial formulation of the herbicide clomazone (Gamit 500 CE, FMC Corporation, Philadelphia, EUA) was used in both experiments. Acetylthiocholine (ASCh), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1-chloro- 2,4 dinitrobenzene (CDNB), bovine serum albumin, Triton X-100, hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Experimental design

Field experiments

Fish were allocated in 2 groups (in triplicate) of 10 animals distributed per tank (30 fish per treatment). One group was the control fish and the other group was the fish exposed to the herbicide, with initial concentration corresponding to 0.5 mg L⁻¹ of clomazone for 7, 30 or 90 days. The concentration chosen (0.5 mg L⁻¹) was in accordance with the calculated concentration of clomazone used in rice fields ranging from 0.4 to 0.7 mg L⁻¹ according to Rodrigues and Almeida (2005). The experiment was carried out in the rice paddy field, with the fish trapped in submersed cages, measuring 0.30 m (diameter) x 1.05 m (length). Herbicide concentration in water was monitored from the first day until it was not detected (Fig. 1). Herbicide was analyzed by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) using the method described by Zanella et al. (2002). After each exposure time (7, 30 or 90 days), a sample of 10 individuals was taken from the tanks and then submitted to blood and tissue (brain, liver and white muscle) collection.

Laboratory experiment

Laboratory experiment was carried out in tanks of 45 L capacity (in triplicate) with 10 fish each. The herbicide concentrations were the same used in the field condition. The herbicide was added only in the beginning of the experiment without water or herbicide replacement. A filter (with wool acrylic) was used in each tank to remove feeding waste. These filters were cleaned every day. After the experimental period, fish were sampled and blood and tissues were collected (brain, liver and white muscle). All protocols used in this study were approved by Committee on ethics and animal welfare of the Federal University of Santa Maria. Protocol number: 23081.010369/2007-58.

Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation was estimated by a thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay performed by an optically measured MDA reaction with TBA. Liver, muscle and brain homogenates (100-400 μL) were added trichloroacetic 10% and 0.67% thiobarbituric acid were added to adjust to a final volume of 1.0 mL. The reaction mixture was placed in a micro-centrifuge tube and incubated for 15 min at 95 °C. After cooling, it was centrifuged at 5,000 X g for 15 min and optical density was measured by spectrophotometer at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmols MDA mg^{-1} protein according to Buege and Aust (1978).

Carbonyl assay

The liver tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 using a glass homogenizer. Protein carbonyl content was assayed by the method described by Yan et al. (1995) with some modifications. Soluble protein (1.0 mL) was reacted with 10 mM DNPH in 2N hydrochloric acid. After incubation at room temperature for one hour in dark, 0.5 mL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing SDS 3.0%), 2.0 mL of heptane (99.5%) and 2.0 mL of ethanol (99.8%) were added sequentially, vortexed for 40s and centrifuged at 10,000 X g for 15 min. Then, the protein isolated from the interface was washed twice by resuspension in ethanol/ethyl acetate (1:1), suspended in 1 mL of denaturing buffer and the carbonyl content was measured spectrophotometrically at 370 nm. The assay was performed in duplicate and two blank tubes incubated with 2 N HCl without DNPH were included for each sample. The total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M cm^{-1} .

Enzyme assays

CAT activity assay

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed in supernatant by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesov 1972). Liver tissue was homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 (1:20 w/v), centrifuged at 10,000 X g for 10 min at 4°C. The assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), 0.05 mL H_2O_2 (0.3 M) and 0.05 mL homogenate. Change of H_2O_2 absorbance in 60 s was measured by at 240 nm. CAT activity was calculated and expressed in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein.

GST Assay

GST activity (liver) was measured in supernatant according to Habig et al. (1974) using CDNB as a substrate. The formation of S-2, 4-dinitrophenyl glutathione (GS-DNB) was monitored by the increase in absorbance at 340 nm against blank. The extinction coefficient used for CDNB was 9.6 mM cm^{-1} . The activity was expressed as $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$.

AChE activity assay

AChE (EC 3.1.1.7) activity was measured using the method described by Ellman et al. (1961) and modified by Miron et al. (2005). Brain and muscle tissues (30 mg) were weighted and homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with sodium phosphate buffer 50 mM pH=7.2 and Triton X-100 1%. The homogenate was then centrifuged for 10 min at 3,000 X *g* at 5°C and the supernatant was used as enzyme source. Aliquots of supernatant (50 and 100 μL) (brain and muscle, respectively) were incubated at 30°C for 2 min with a solution containing 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.5 and 1 mM DTNB. After the incubation period, the reaction was initiated by the addition of ASCh (0.5 mM). The final volume was 2.0 mL. Absorbance was measured by spectrophotometry (Femto Scan spectrophotometer) at 412 nm for 2 min. Enzyme activity was expressed as $\mu\text{mol of ASCh hydrolyzed min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$.

Protein determination

Protein was determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard. Absorbance of samples was measured at 595 nm (Bradford et al., 1976).

Metabolic parameters

Liver and muscle glycogen were determined by the method described by Bidinotto et al. (1998) after KOH (6N) and ethanol addition for hydrolysis and precipitation of glycogen. For protein determination, tissues were heated with KOH at 100 °C and centrifuged at 10,000 X *g* for 10 min. Supernatant was used to estimate the protein level according to the method described by Lowry et al. (1951). For lactate, glucose and ammonia determination, tissue samples were homogenized by adding 10% trichloroacetic acid (1:20 dilution) using a motor-driven Teflon pestle and centrifuged at 1,000 X *g* for 10 min for flocculation of the proteins. The completely

deproteinated supernatant was used for lactate determination using the method described by Harrower and Brown (1972). Glucose was measured according to Park and Johnson (1949) and ammonia was measured according to Verdouw et al. (1978). For amino acid quantification, tissues (liver and muscle) were mechanically disrupted twice by adding 2 mL phosphate buffer 20 mM, pH 7.5 and the homogenates were centrifuged at 1,000 X *g* for 10 min. The neutral supernatant extracts were used for colorimetric amino acid determination according to Spies (1957). Plasma glucose was measured by the glucose oxidase method with Bioclin test Kit. Plasma was dissolved in 10% trichloroacetic acid (1:20 dilution) and lactate was estimated according to Harrower and Brown (1972). Plasma total protein levels were measured according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

Statistical Procedures

Comparisons between controls and data of clomazone exposed groups (field or laboratory) were made using data following normal distribution and analyzed by Student t-test (parametric determinations). We compared each control with its respective exposed group (field and laboratory). Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant for all statistical analyses.

Results and Discussion

Oxidative stress

After 7 days of exposure to clomazone in the fields, TBARS levels increased in liver and in the brain (Table 1). These results suggest lipid damage on tissues and could be a good oxidative stress indicative. However, this parameter did not change in muscle tissue. TBARS increase was observed in other fish species on days 4 and 8 after exposure (Crestani et al., 2007; Gluszczak et al., 2007). Other parameters such as protein carbonyl and GST did not show alterations under field conditions (Fig. 2 and 3). Our study showed a decrease of the CAT activity in the liver of *C. carpio* exposed to clomazone for 7 days in rice field conditions (Fig. 4). Previous experiments in our laboratory (Crestani et al., 2007, Miron et al., 2008) showed similar results when fish were exposed to clomazone. Moraes et al. (2009) showed the same results in field experiments using clomazone and propanil. In oxidative stress situation induced by herbicides, tissues exhibited different responses

concerning antioxidant defenses. In the present study oxidative damage caused by clomazone in the fields may suppress the antioxidant defense represented by CAT causing a loss of compensatory mechanism. Another hypothesis that the increase in oxyradicals directly affected CAT activity. After 7 days of exposure, brain, liver, and muscle showed increased TBARS levels under laboratory conditions (Table 1). The oxidative damage remained in these tissues only under laboratory exposure. In liver, carbonyl levels were decreased, whereas CAT activity increased (Fig. 2, 4). The decrease in protein carbonyl levels according to some authors may indicate that the susceptibility to protein degradation could have been increased by the oxidation of proteins (Almroth et al., 2005). Parvez et al., (2006) also found reduction in protein carbonyl levels in liver, kidney and gills of *Wallago attu* exposed to several pollutants in a site of the Yamuna river. Our findings showed a typical response of fish against herbicide toxicity, with the increase of CAT activity in the liver, which probably occurred in response to increased hepatic levels of oxyradicals such as reactive oxygen species. TBARS increase in liver could also be related to CAT increase. A significant increased CAT activity was also observed in some studies after the exposure to different pollutants and pesticides (Zhang et al., 2004; Peixoto et al., 2006; Moraes et al., 2007). When *Leporinus obtusidens* were exposed to clomazone and propanil in rice paddy fields, the CAT activity enhanced (Moraes et al., 2007). GST enzyme showed no alterations under laboratory or field conditions after 7 days of exposure (Fig. 3).

After 30 days of exposure under field conditions, TBARS levels showed an increase in white muscle, whereas in brain tissue a decrease was observed. In liver tissue no alterations were recorded for this parameter (Table 1). LPO is one of the main processes induced by oxidative stress (Oruç and Usta, 2007). As LPO is considered a valuable indicator of oxidative damage of cellular components, our results suggest that the increase of TBARS in white muscle of *Cyprinus carpio* after exposure to clomazone indicates oxidative stress in this tissue. Moreover, antioxidant defenses were not totally able to effectively scavenge ROS leading, this way, to LPO. In this same period, protein carbonyl levels enhanced (Fig. 2). Thus, protein carbonylation resulting in protein oxidation could be linked to increased TBARS levels due to ROS formation, which in turn directly attack protein and lead to the carbonyl formation. Such finding is also considered by some other authors (Bainy et al., 1996). Our results are in agreement with Parvez and Raisuddin (2005), who observed an

increase in protein carbonyl levels of fish (*Channa punctata*) exposed to different pesticides. An increase in protein carbonyl levels indicates that normal protein metabolism was disrupted (Almroth et al., 2005). GST is an important enzyme involved in catalyzing the conjugation of a wide variety of electrophilic substrates to reduced glutathione. Furthermore, it protects the cell against effects of xenobiotics (Ferrari et al., 2007). In the present work, GST activity showed a significant reduction in liver after exposure to commercial formulation of clomazone (Fig.3). The GST enzyme remained inhibited in the hepatic tissue of *C. carpio* after 30 and 90 days of clomazone exposure. Decreased GST activity during this exposure period may suggest a failure of detoxification and the occurrence of oxidative stress. The induction of GST in fish tissues is considered beneficial to handle a stress condition. However, the decrease of such activity is little known. The inhibition of GST activity in hepatic tissue may occur because liver is one of the first organs exposed to the toxicant effects. This result is in agreement with Ballesteros et al. (2009) who observed decreased GST in gills, liver, and muscle of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan; and Menezes et al (2011) who found a decrease of GST in liver of *Rhamdia quelen* exposed to Roundup.

After 90 days, TBARS levels increased in the brain and remained enhanced in muscle tissue (Table 1), indicating that a condition of stress remained in this fish species after long term exposure. Liver tissue showed no alterations in TBARS levels. The carbonyl protein increased in liver (Fig. 2) probably due to an oxidative stress status. This parameter serves as a good biomarker for oxidative stress, especially in environmental contamination contexts. The activity of the CAT enzyme was significantly decreased in liver of fish exposed to clomazone (Fig. 4). Our results are in agreement with Dorval and Hontela (2003) who found reduced CAT activity in *Oncorhynchus mykiss* after exposure to endosulfan. Ballesteros et al., (2009) also observed a decrease in the CAT activity in liver of *Jenynsia multidentata* after endosulfan insecticide exposure. The GST enzyme remained inhibited in the hepatic tissue of *C. carpio* exposed to clomazone herbicide after 90 days. Results concerning oxidative stress and antioxidant parameters could be related to cumulative effects of clomazone because the herbicide was detected in rice field water only until 14 days (Fig. 1), whereas some effects appear after prolonged exposure (30 and 90 days). Considering that clomazone residues been found in rice-field crops after only short periods of exposure compared with our experimental period (30 or 90 days), the

possibility of the herbicide per se, or some metabolite derivative, causing oxidative damage in fish tissues is an acceptable conclusion.

AChE enzyme

After 7 days of exposure under field conditions, the AChE activity was altered neither in the brain nor in muscle when compared to control (Fig. 5A and 5B). Under laboratory conditions, AChE enzyme in the muscle tissue showed an inhibition when compared to control (Fig. 5B), however, the brain was not altered (Fig. 5A). Under laboratory conditions, Crestani et al. (2007) found that clomazone herbicide is a potent brain and muscle AChE inhibitor of *Rhamdia quelen*, reaching the maximum of 45-47% of inhibition at concentrations 0.5 or 1.0 mg L⁻¹. Another study indicated that higher concentrations (5, 10 or 20 mg L⁻¹) of a commercial formulation of clomazone, also under laboratory conditions, caused inhibition in the AChE activity in the brain and muscle of silver catfish (Miron et al., 2005). The results of our study showed that the carps in relation to other species of fish seem to be more resistant to rupture of AChE activity when exposed to clomazone under field conditions. In addition, clomazone concentrations used in rice fields would not be enough to cause changes in brain AChE. However, muscle tissue showed reduced AChE activity under laboratory condition. This result showed clearly clomazone interaction with enzyme maybe by reducing enzyme cofactors or binding with some amino acids changing enzyme active structure. More studies are needed to understand AChE inhibition by clomazone.

After 30 and 90 days of exposure, the AChE activity showed no alterations for the tissues under field conditions. In another rice paddy experiment, a 30-day exposure of *Leporinus obtusidens* to clomazone (0.5 mg L⁻¹) showed inhibition of the activity in the brain and also an increased activity in muscle (Moraes et al., 2007). In another study with 90 days of clomazone exposure, *L. obtusidens* showed a reduction in the AChE activity in both tissues (brain and muscle) (Moraes et al., 2009).

The inhibition or activation of AChE may affect the process of cholinergic neurotransmission and promote undesirable effects in fish. The reduction of muscle AChE activity found in our investigation may have been caused by the herbicide molecule and/or the adjuvants used in the formulation due to absence of clomazone residues in water after 14 days of experiment (Fig. 1). The absence of effects could

indicate that the brain and muscle of carps are not affected by the commercial formulation of herbicide containing clomazone.

Metabolic parameters

It is known that glycogen decrease is the most common response due to stress situation generated by herbicide exposure. However, after 7 days of exposure to both conditions, the liver and muscle tissues showed an increase of glycogen (Table 2). These results are in disagreement with other studies that have shown the glycogen reduced levels in tissues as a result of the stress response caused by pesticide exposure (Begum and Vijayarghavan, 1999; Gluszczak et al., 2006; Fonseca et al., 2008). However, Crestani *et al.*, (2006) in a laboratory study also found increased hepatic glycogen levels in *Rhamdia quelen* exposed to clomazone herbicide. A similar study considering the two experimental conditions, field and laboratory, showed glycogen increase in liver and muscle after 7 days of herbicide exposure. In addition, this study showed muscle glycogen increase after 7 and 30 days of imazetahpyr and imazapic exposure (Moraes et al., 2011). Glycogen increased levels in tissues of *C. carpio* suggest that this species stores glycogen by increasing glycogen synthesis. Muscle glucose levels were increased after 7 days of exposure to field conditions and slowly reduced after exposure to laboratory conditions. This difference occurs probably due to some environmental conditions such as climate change that may interfere with the metabolism of fish, which does not occur in the laboratory, where the experimental conditions are controlled.

Under field conditions, lactate levels did not change in liver, whereas they were increased in muscle indicating an anaerobic metabolism by the increase of lactate to maintain glucose reserves as liver glycogen and muscle glucose. Under laboratory conditions, liver showed an increase of lactate levels, however, in muscle no alteration was observed. According to Gluszczak et al. (2006), the elevation of lactate also indicates metabolic disorders and a clear response against energy depletion. Protein levels in the liver increased after 7 days, decreased after 30 days and did not change after 90 days of clomazone exposure in field conditions. The muscle protein showed no change compared with the control under field conditions. However, under laboratory conditions, protein levels did not change in the same tissues (Table 2). These variations in levels of liver protein indicate that oxidative stress caused by exposure to the herbicide resulted in a significant variation in the

energy requirements of fish directly related to exposure time and conditions of the experiment (field or laboratory). Crestani et al. (2006) also found increased protein levels in liver of *Rhamdia quelen* after 192 h of exposure to clomazone herbicide. After exposure to field conditions, the amount of ammonia in liver was increased, but it did not change in muscle. After laboratory exposure, the amount of ammonia was unaltered in liver and enhanced in muscle tissue. Our results are in agreement with those obtained by Gluszczak et al. (2006, 2007), where the fish exposed to glyphosate herbicide showed an increase in ammonia levels in liver and muscle. Under both experimental conditions, amino acid levels were reduced in the muscle tissue. In plasma, there was a decrease in protein under both exposure conditions. Lactate levels were increased in plasma after exposure under laboratory conditions and decreased in plasma of fish exposed under field conditions. The reduction of lactate in plasma is related with hepatic drainage of lactate to maintain hepatic gluconeogenesis. In both conditions of exposure an increase in the plasmatic glucose levels was observed. The high level of blood glucose is a secondary indicator of stress (Table 2).

After 30 days of exposure, the amount of hepatic and muscular glycogen did not change. In liver, there was a reduction in lactate levels, but in muscle this parameter was not modified. This decrease may indicate higher gluconeogenesis adaptation. Fonseca *et al.*, (2008) also observed a decrease of lactate in liver and muscle of *Leporinus obtusidens* after exposure to 2,4-D herbicide. In liver, protein levels were decreased, but no alterations were detected in muscle. In both tissues, there was a reduction in ammonia levels. Glucose levels were decreased in muscle of *C. carpio* exposed to clomazone. In plasma, lactate and glucose levels were enhanced showing that the disorder remains in the metabolism of fish exposed to herbicide.

After 90 days of exposure, there was an increase in glycogen levels and a reduction in ammonia levels in liver, but no alterations were observed in the other parameters. Glycogen increased levels after prolonged exposure could be an indicative that fish reduced consume of carbohydrate sources such as glycogen. The consequence of the increased glycogen levels may be either a reduction in its use or an increase of its synthesis as showed by Moraes et al., (2011), where liver and muscle glycogen increased after 7 days of laboratory exposure to imazethapyr and imazapic. The same herbicide increased muscle glycogen in field after 30 days of

exposure. In the muscle tissue, there was only a decrease in amino acid levels. In plasma, decreased protein levels and a hyperglycemia situation was maintained. These results show that protein oxidation persists and hyperglycemia situation indicated a long time response to clomazone toxicity. Clomazone induce alterations in metabolic parameters probably due to changes in some enzyme cofactor or binding in essential enzymes for metabolism disrupting your function. In fact, fish adopt strategies to combat herbicide toxicity and measurements of metabolic parameters could provide good toxicity indicators.

Conclusion

The present study showed that commercial herbicide formulation containing clomazone at paddy rice field concentrations may cause changes in toxicological and metabolic parameters of *C. carpio* grown in the rice paddy. Some of the results obtained under laboratory conditions were similar to those observed under field conditions. However others are different contrasting laboratory and field tests. There are long term effects of the herbicide in the fish metabolism. Therefore, these parameters can be used to evaluate clomazone toxicity in fish tissues.

Acknowledgements

We would like to thank the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) for the support and the facilities, CNPq/CT-HIDRO 552546/2007-09 for the financial support, and Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) for the scholarship and the undergraduate student grant.

References

- Almroth BC, Sturve J, Berglund A, Förlin, L (2005) Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat Toxicol* 73:171-180
- Almroth BC, Sturve J, Stephensen E, Holth TF, Förlin L (2008) Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Mar Environ Res* 66:271-277
- Ballesteros ML, Wunderlin DA, Bistoni MA (2009) Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Safe* 72:199-205
- Bainy ACD, Saito E, Carvalho PSM, Junqueira VBC (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat Toxicol* 34:151-162
- Begum G, Vijayaraghavan S (1999) Effect of acute exposure of the organophosphate insecticide rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environ Res* 80:80-83
- Bidinotto PM, Moraes G, Souza RHS (1998) Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Téc. CEPTA* 10:53-60
- 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
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52:302-309
- Cardoso LM, Colombari DSA, Menani JV, De Paula PM, Chianca DA, Colombari E (2006) Espécies reativas de oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial. *Med* 39(1):77-88
- Castagnolli N, Cyrino JEP (1986) *Piscicultura nos Trópicos* (Ed.), Manole LTDA, São Paulo, pp 152
- Crestani M, Menezes C, Gluszczak L, Miron DS, Lazzari R, Duarte MF, Morsch VM, Pippi AL, Vieira VP (2006) Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol Environ Safe* 65:48-55

- Crestani M, Menezes C, Gluszczak L, Miron DS, Spanevello R, Silveira A, Gonçalves FF, Zanella R, Loro VL (2007) Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67:2305-2311
- Dorval J, Hontela A (2003) Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Appl Pharm* 92:191-200
- Ellman GL, Courtney KD, Andres JrV (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95
- Ferrari A, Venturino A, Pechén de D'Angelo AM (2007) Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pest Biochem Phys* 88:134-142
- Fonseca MB, Gluszczak L, Moraes BS, Menezes CC, Pretto A, Tierno MA, Zanella R, Gonçalves FF, Loro VL (2008) 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Safe* 69:416-420
- Gluszczak L, Miron DS, Crestani M, Fonseca MB, Pedron FA, Duarte MF, Vieira VLP (2006) Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Safe* 65:237-241
- Gluszczak L, Miron DS, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MRC, Morsch VM, Loro VL (2007) Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Phys* 146:519-524
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139
- Harrower JR, Brown CH (1972) Blood lactic acid, a micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J App Phys* 32:709-711
- Lowry DH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Marchesan E, Zanella R, Avila LA, Camargo ER, Machado SLO, Macedo VRM (2007) Rice herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. *Sci Agric* 64:176-180
- Menezes CC, Fonseca MB, Loro VL, Santi A, Cattaneo R, Clasen B, Pretto A, Morsch VM (2011) Roundup Effects on Oxidative Stress Parameters and

- Recovery Pattern of *Rhamdia quelen*. Arch Environ Contam Toxicol 60 (4): 665-671
- Miron D, Crestani M, Schetinger MR, Morsch VM, Baldisserotto B, Tierno MA, Moraes G, Vieira VLP (2005) Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). Ecotoxicol Environ Safe 61:398-403
- Miron DS, Pretto A, Crestani M, Gluszczak L, Shettinger MR, Loro VL, Morsch VM (2008) Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere 74:1-5
- Moraes BS, Loro VL, Gluszczak L, Pretto A, Menezes C, Marchezan E, Machado O (2007) Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere 68:1597-1601
- Moraes BS, Loro VL, Fonseca MB, Menezes CC, Marcehsan, E, Reimche GB, Ávila LA (2009) Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. Ecotoxicol Environ Safe 95: 57-62
- Moraes BS, Clasen B, Loro VL, Pretto A, Toni C, Ávila LA, Marchesan E, Machado SLO, Zanella R, Reimche GB (2011) Toxicological responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. Ecotoxicol Environ Safe 74: 328-335
- 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
- Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical. Bio Med 31:1287-1312
- Oruç EO, Usta D (2007) Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. Environ Toxicol Pharmacol 23:48-55
- Park JT, Johnson MJ (1949) A submicro determination of glucose. J Biol Chem 181:149-151
- Parvez S, Pandey S, Ali M, Raisuddin S (2006) Biomarkers of oxidative stress in *Wallago attu* (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. Sci Total Environ 368:627-636

- Parvez S, Raisuddin S (2005) Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ Toxicol Pharmacol* 20:112-117
- Peixoto F, Alves-Fernandes D, Santos D, Fontainhas-Fernandes A (2006) Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pest Biochem Phys* 85:91-96
- Rodrigues BN, Almeida FS (2005) Guide to herbicide. Fifth Edition. Londrina PR, Brasil 461-466
- Senseman SA (2007) Herbicide Handbook. Weed Science Society of America, Ninth Edition, pp 458
- Spies JR (1957) Colorimetric procedures for amino acids. *Method Enzymol* 3:467-477
- Verdouw H, Vanechteld CJA, Deckkers EMJ (1978) Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res* 12:399-402
- Yan LJ, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 228:349-351
- Yi MQ, Liu HX, Shi XY, Liang P, Gao XW (2006) Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. *Comp Biochem Physiol C* 143:113 -116
- 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. *Chromatographia* 55:573-577
- Zhang J, Shen H, Wang X, Wu J, Xue Y (2004) Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 55:167-174

Table 1: LPO measured through TBARS levels (nmol MDA mg⁻¹ of protein) in brain, liver and muscle of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days . Data represent the mean \pm SD (n=30).

Time (days)	Brain		Liver		Muscle	
Laboratory	control	treatment	control	treatment	control	treatment
7	3.315 \pm 0.55 ^a	4.425 \pm 0.73 ^b	2.048 \pm 0.25 ^a	2.526 \pm 0.18 ^b	0.990 \pm 0.15 ^a	1.500 \pm 0.21 ^b
Field						
7	4.596 \pm 0.49 ^a	7.087 \pm 0.86 ^b	1.852 \pm 0.36 ^a	7.512 \pm 1.31 ^b	1.100 \pm 0.18 ^a	1.068 \pm 0.13 ^a
30	6.252 \pm 0.60 ^a	4.011 \pm 0.20 ^b	3.218 \pm 0.71 ^a	3.656 \pm 0.53 ^a	1.024 \pm 0.03 ^a	1.716 \pm 0.13 ^b
90	4.884 \pm 0.17 ^a	5.070 \pm 1.12 ^b	1.992 \pm 0.18 ^a	1.788 \pm 0.17 ^a	0.862 \pm 0.12 ^a	1.410 \pm 0.29 ^b

Different letters indicate significant difference between control and herbicide group ($p \leq 0.05$).

Table 2: Liver, muscle and plasma metabolites of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days . Data represent the mean \pm SD (n=30).

Time	Liver		Muscle		Plasma	
Laboratory	control	treatment	control	treatment	control	treatment
7 days						
Glycogen	36.1 \pm 4.0 ^a	138.1 \pm 20.7 ^b	11.2 \pm 2.3 ^a	13.6 \pm 2.4 ^b	NM	NM
Glucose	NM	NM	0.7 \pm 0.2 ^a	0.6 \pm 0.1 ^b	38.5 \pm 5.5 ^a	60.5 \pm 7.9 ^b
Lactate	9.3 \pm 1.3 ^a	12.9 \pm 1.0 ^b	29.1 \pm 4.4 ^a	26.9 \pm 3.6 ^a	6.5 \pm 1.2 ^a	10.6 \pm 1.5 ^b
Protein	123.6 \pm 14.7 ^a	117.9 \pm 5.2 ^a	210.6 \pm 2.3 ^a	208.0 \pm 8.7 ^a	16.9 \pm 1.6 ^a	11.8 \pm 1.8 ^b
Ammonia	220.1 \pm 15.7 ^a	235.2 \pm 34.1 ^a	22.5 \pm 6.7 ^a	31.6 \pm 12.2 ^b	NM	NM
Amino acids	NM	NM	29.7 \pm 6.3 ^a	20.3 \pm 7.7 ^b	NM	NM
Field						
7 days						
Glycogen	30.4 \pm 9.4 ^a	46.9 \pm 10.9 ^b	2.0 \pm 0.3 ^a	3.4 \pm 0.27 ^b	NM	NM
Glucose	NM	NM	0.6 \pm 0.09 ^a	2.1 \pm 0.2 ^b	52.6 \pm 11.0 ^a	68.0 \pm 8.6 ^b
Lactate	15.3 \pm 2.1 ^a	16.4 \pm 1.3 ^a	20.2 \pm 2.3 ^a	23.0 \pm 1.5 ^b	2.6 \pm 0.05 ^a	1.8 \pm 0.7 ^b
Protein	132.8 \pm 43.3 ^a	314.5 \pm 36.5 ^b	188.4 \pm 8.2 ^a	183.7 \pm 5.6 ^a	41.3 \pm 3.3 ^a	28.4 \pm 2.8 ^b
Ammonia	101.4 \pm 15.0 ^a	323.6 \pm 24.4 ^b	28.7 \pm 4.3 ^a	32.2 \pm 3.0 ^a	NM	NM
Amino acids	NM	NM	66.1 \pm 6.2 ^a	42.3 \pm 9.1 ^b	NM	NM
30 days						
Glycogen	45.2 \pm 11.9 ^a	52.7 \pm 14.4 ^a	5.2 \pm 1.1 ^a	6.6 \pm 1.3 ^a	NM	NM
Glucose	NM	NM	1.5 \pm 0.5 ^a	0.35 \pm 0.1 ^b	34.2 \pm 7.1 ^a	55.5 \pm 15.9 ^b
Lactate	12.0 \pm 0.8 ^a	9.4 \pm 1.2 ^b	25.5 \pm 4.2 ^a	24.6 \pm 1.5 ^a	3.2 \pm 0.4 ^a	4.3 \pm 0.4 ^b
Protein	121.9 \pm 22.5 ^a	87.1 \pm 12.4 ^b	235.4 \pm 11.7 ^a	238.0 \pm 27.7 ^a	41.0 \pm 9.0 ^a	47.9 \pm 10.0 ^a
Ammonia	112.2 \pm 54.4 ^a	38.4 \pm 16.6 ^b	30.2 \pm 2.4 ^a	26.2 \pm 2.3 ^b	NM	NM
Amino acids	NM	NM	50.0 \pm 4.3 ^a	47.1 \pm 3.6 ^a	NM	NM
90 days						
Glycogen	24.5 \pm 5.5 ^a	37.9 \pm 12.8 ^b	6.6 \pm 1.5 ^a	6.9 \pm 1.8 ^a	NM	NM
Glucose	NM	NM	0.45 \pm 0.1 ^a	0.51 \pm 0.2 ^a	59.3 \pm 4.6 ^a	100.5 \pm 14.2 ^b
Lactate	14.0 \pm 1.2 ^a	16.2 \pm 0.9 ^a	27.0 \pm 1.9 ^a	27.7 \pm 4.5 ^a	1.4 \pm 0.4 ^a	1.7 \pm 0.5 ^a
Protein	146.4 \pm 32.5 ^a	117.6 \pm 21.6 ^a	235.4 \pm 32.4 ^a	236.9 \pm 35.3 ^a	51.2 \pm 6.7 ^a	38.5 \pm 6.3 ^b
Ammonia	110.4 \pm 13.4 ^a	84.7 \pm 8.8 ^b	33.8 \pm 9.6 ^a	33.9 \pm 4.9 ^a	NM	NM
Amino acids	NM	NM	59.7 \pm 7.2 ^a	48.7 \pm 9.0 ^b	NM	NM

Glucose, glycogen and lactate in tissue were expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ tissue. Protein was expressed in mg g^{-1} tissue or mg mL^{-1} plasma, lactate plasma expressed in $\mu\text{mol mL}^{-1}$ and glucose in mg dL^{-1} plasma. Different letters indicate significant difference between control and herbicide group ($p \leq 0.05$). NM (not measured).

FIGURE CAPTIONS

Fig.1 Clomazone concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) in water of rice paddy field.

Fig.2 Liver protein carbonyl levels in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).

Fig.3 Liver tissue glutathione S-transferase (GST) activity in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg/L) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).

Fig.4 Liver tissue catalase (CAT) activity in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).

Fig.5 Acetylcholinesterase (AChE) activity in brain (A) and muscle (B) tissue of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).

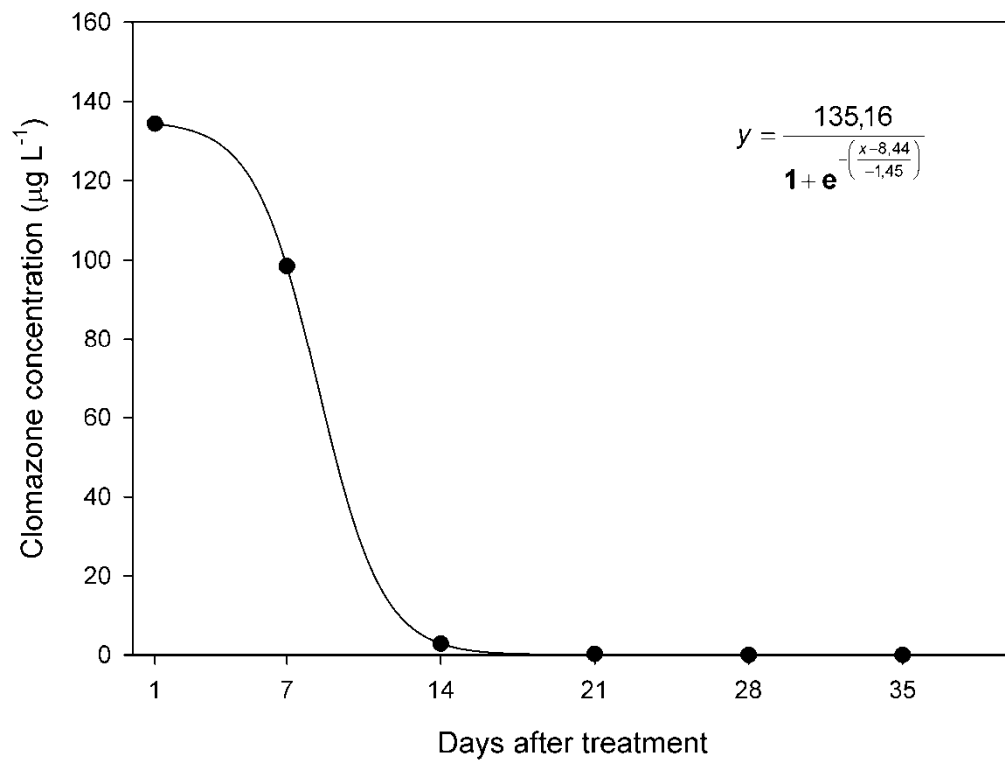


Fig.1 Clomazone concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) in water of rice paddy field.

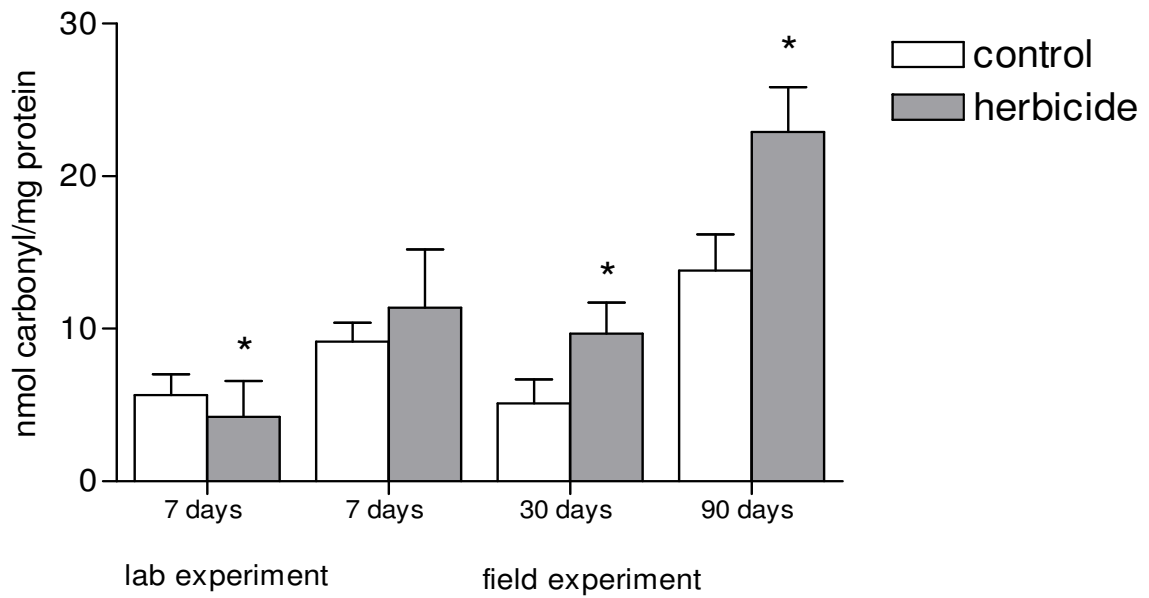


Fig.2 Liver protein carbonyl levels in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD ($n=30$). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).

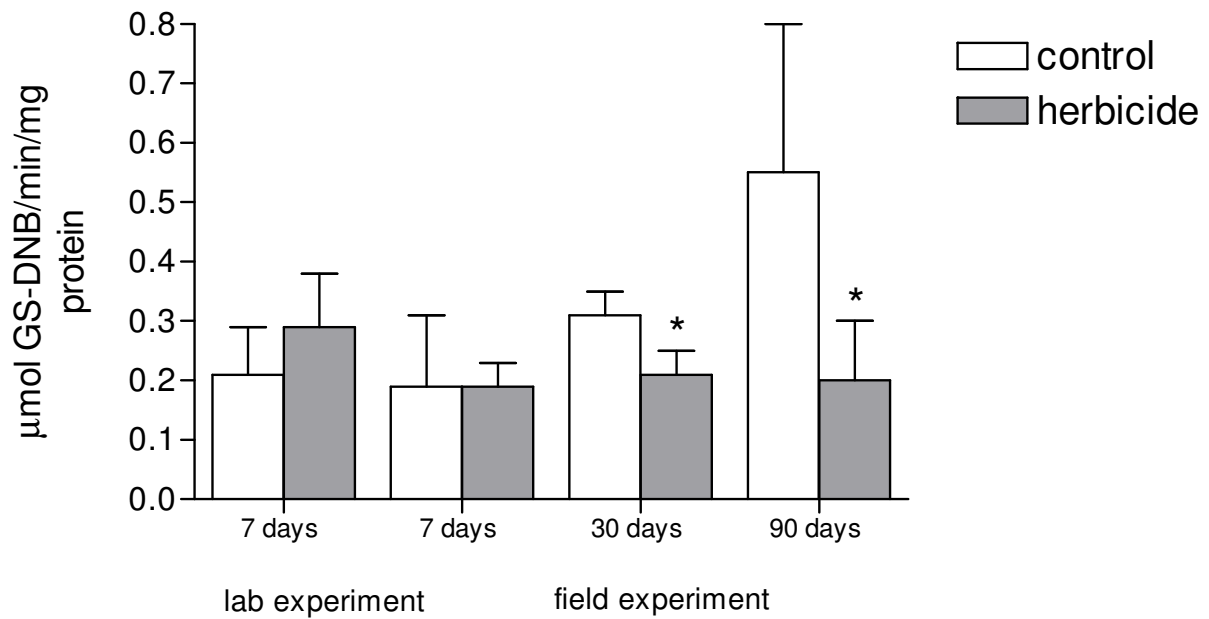


Fig.3 Liver tissue glutathione S-transferase (GST) activity in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg/L) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30).

*Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).

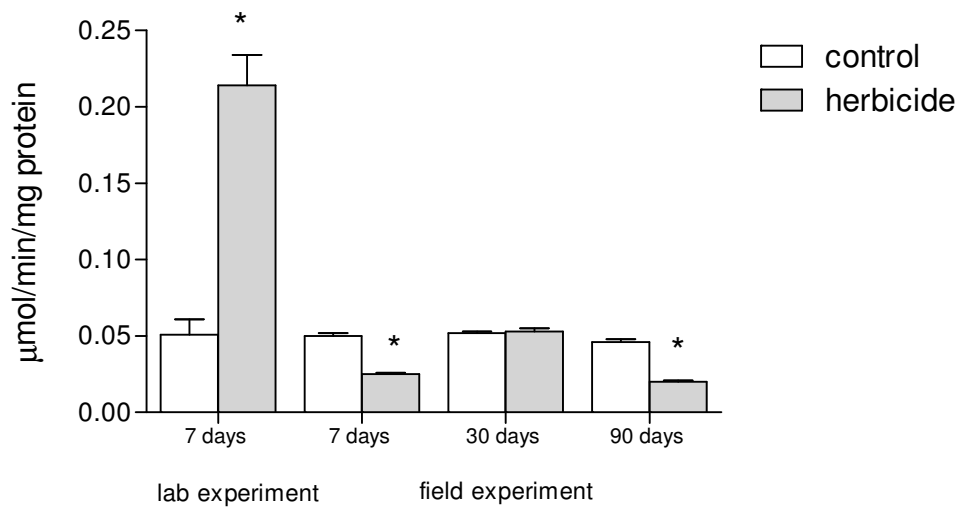


Fig.4 Liver tissue catalase (CAT) activity in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=30). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).

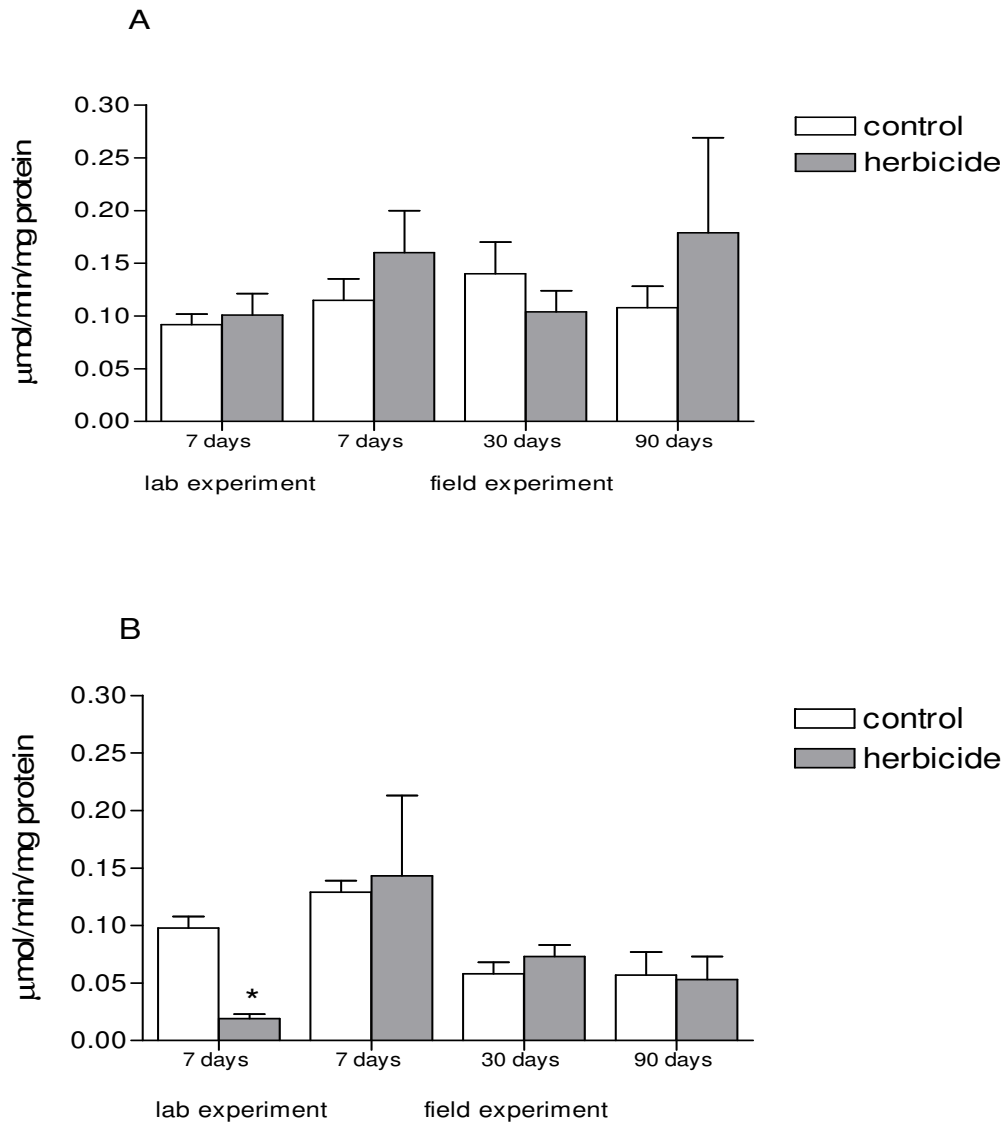


Fig.5 Acetylcholinesterase (AChE) activity in brain (A) and muscle (B) tissue of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone (0.5 mg L^{-1}) under laboratory (7 days) and rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD ($n=30$). *Indicates significant difference between control and herbicide group ($P \leq 0.05$).

4.3 Manuscrito II

High concentrations of the herbicide clomazone induces genotoxicity and oxidative damage in blood cells of *Cyprinus carpio*

Roberta Cattaneo, Alessandra P. Vargas, Alexssandro G. Becker, Douglas M. Ceolin, Barbara Clasen, Vânia Lucia Loro, Bernardo Baldisserotto, João Batista Teixeira da Rocha

Submetido a revista: Ecotoxicology and Environmental Safety

High concentrations of the herbicide clomazone induces genotoxicity and oxidative damage in blood cells of *Cyprinus carpio*

Cattaneo, R^a., Vargas, A.P^b., Becker, A.G^C., Ceolin, D.M^b., Clasen, B^a., Loro, V.L^{a*}.,
Baldisserotto, B^C., Rocha, J.B.T^b.

^aLaboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^bLaboratório de Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^CDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding Author:

*Dr^a Vania Lucia Loro

Laboratório de Toxicologia de pesticidas em peixes

Departamento de Química - Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria

97105-900 Santa Maria RS

Brazil

Phone: + 55 55 3220-9456

Abstract

Clomazone (isoxazolidinone) is widely used in agriculture, especially in paddy rice fields in Southern Brazil, with activity against Poaceae. The genotoxic and pro-oxidant parameters in peripheral blood of carp (*Cyprinus carpio*) exposed for 7 days to 5.0 mg L⁻¹ of clomazone herbicide were determined by the micronucleus (MN) test, comet assay expressed by damage index (DI), and determination of reactive oxygen species (ROS). Ours results show that clomazone exposure caused a significant increased in the rate of MN, comet assay and ROS. Based on this, we can infer that the clomazone herbicide may be considered dangerous to those fish species.

Keywords: Clomazone, reactive oxygen species, genotoxic, *Cyprinus carpio*

1. Introduction

Genetic disorders and physiologic alterations can be caused by chemical agents, even in low concentrations (Hehls and Segner, 2001). Agricultural practice relations with the use of the herbicide in high concentrations lead to surface water contamination and, consequently, the contamination of these environments caused alterations on locomotion, equilibrium, feeding, escape, and reproductive behavior of fishes (Saglio and Trijasse, 1998; Bretaud et al., 2000; Miron et al., 2005).

Clomazone herbicide, belonging to the class isoxazolidinone, is widely used in agriculture, especially in paddy rice fields in Southern Brazil (Rodrigues and Almeida, 2005). It has been reported to contaminate surface waters and at concentrations used in agriculture it affects metabolic and oxidative parameters of different fish species (Crestani et al., 2006; Moraes et al., 2007). Zanella et al. (2002) reports that the clomazone residues can last for up to 130 days in agricultural water and be detected in 90% of water samples collected from courses near rice cultivation regions. Thus, this herbicide can reach rivers, lakes, streams and springs of water through the constant leakage of water from these crops in times of planting and harvesting, or leaching during the rains (Van Der Oost et al., 2003), reaching non-target organisms such as fish and causing disturbances in endocrine function, which is directly linked to reproduction and mortality (kime et al., 1995).

Herbicides and pesticides may induce the formation of reactive oxygen species (ROS); these substances are highly reactive causing damage to lipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids (Fraga et al., 1996; Sevgiler et al., 2004; Moraes et al., 2007). As many of the xenobiotics are known or suspected mutagens/carcinogens, mutagenicity tests have also been applied to aquatic toxicology (Scarpato et al., 1990). Genotoxicity biomarkers are widely measured in ecotoxicology as molecular toxic endpoints of major environmental pollutants (Wessel et al., 2007) including micronucleus test (Nigro et al., 2006; Pavlica et al., 2000) and comet assay (Cheung et al., 2007; Sharma et al., 2007).

Carp fish family Cyprinidae, genus *Cyprinus*, species *Cyprinus carpio* is an exotic species of Asian origin, originated in China over two thousand years ago (Castagnolli and Cyrino, 1986). It is one of the most important fish cultured in the world (Vandeputte, 2003; Toni et al., 2011). In Southern Brazil, this species of fish has been used in polyculture systems where there is a practice of rice–fish culture (Silva et al., 2006; Toni et al., 2011). Thus, the aim of this study was to evaluate the genotoxic effects induced by clomazone herbicide, using carp (*Cyprinus carpio*) as test-system, by micronucleus (MN) and the damage index (DI) by comet assay. In addition, we evaluated the levels of ROS formation in blood of carp exposed to herbicide.

2. Materials and Methods

2.1 Fish

Common carp (12.8 ± 0.7 g and 12.0 ± 0.5 cm) were obtained from a fish farm (RS, Brazil). Fish were maintained in continuously aerated 250L tanks with a natural photoperiod (12-h light/12-h dark) for at least 10 days prior to experiments. During this period, they were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil) in the proportion of 1% of the total biomass up to 24 h before experiment and also, during clomazone exposure following Phyu et al. (2006). Feces were siphoned out twice a week and at least 50% of the water was renewed. An acrylic wool filter was used in each box to remove feeding waste; these filters were cleaned every day. During all experimental period the average water parameters

were: temperature 23 ± 0.1 °C, pH 7.5 ± 0.2 units, dissolved oxygen 8.2 ± 1.3 mg L⁻¹, total ammonia 0.04 ± 0.0015 mg L⁻¹, and nitrite 0.03 ± 0.015 mg L⁻¹. The methodology of this experiment was approved by the Ethical and Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (process number 23081.007491/2010-42).

2.2 Chemicals

The herbicide clomazone (2-(2-chlorophenyl) methyl-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone) used in this study was obtained commercially from the FMC Corporation (Gamit[®], 50% purity, Philadelphia, EUA) and dissolved in water. Low and normal melting point agaroses were supplied by Shanghai Sangon Bioengineering (China). Dichlorofluorescein diacetate (DCFHDA), dichloro-fluorescein (DCF), Methanol and Giemsa solutions were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Sodium chloride were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

2.3 Experimental design

2.3.1 Exposures

After acclimation, fish were transferred to continuously aerated 250 L boxes (groups of 6 fish per box, all exposures were performed in triplicate) and exposed for 7 days to the following clomazone nominal concentration 5.0 mg L⁻¹. The control group was maintained in the same conditions, but without the herbicide. The herbicide was added to the water only at the beginning of the experiment. An acrylic wool filter was used in each box to remove feeding waste; these filters were cleaned every day. Water parameters did not change throughout the experimental period, as described in the Table 1. The herbicide was analyzed every day by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) using the method described by Zanella et al. (2002) and average results were 4.24 mg L⁻¹ of clomazone.

2.3.2. Determination of ROS formation in Total Blood

The levels of ROS in total blood aliquots were measured by the oxidation of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFHDA) (Wang and Joseph 1999). Total blood was maintained in ice in 150 mM NaCl medium, pH 7.4. To quantify the ROS level, an aliquot (200 μ L) of the total blood was mixed with 2.74 mL of NaCl buffer and pre-incubated for 30 min containing DCFHDA (20 μ M). The formation of the oxidized fluorescent derivative 2,7-dichlorofluorescein (DCF) was monitored using excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively (Fluorescence spectrophotometer, Hitachi F-2000).

2.3.3 Comet assay

Comet assay was performed according to Singh et al. (1988) and Santos *et al* (2009), with slight modifications. Heparinized whole blood samples were collected and diluted 1/500 (v/v) in hank solution (HBSS). Aliquots were retired and slides were prepared according to the procedure. For the analyses, one hundred randomly selected cells (erythrocytes) per sample were scored visually according to tail intensity (completely undamaged: 100 cells x 0 to maximum damaged - 100 cells x 4). DNA damage levels are expressed as percentages of cells damaged compared to control and DI as arbitrary units (A.U.).

2.3.4 Micronuclei assay

The frequency of micronuclei (MN) in the erythrocytes was evaluated according to the criteria described by Countryman and Heddle (1976) and Fenech (1993). Immediately after sampling, a drop of blood was smeared on clean slides, which were dried at room temperature and after 24 h were fixed in 100% methanol for 10 min. Afterwards, they were stained with 4% Giemsa solution for 10 min, air-dried, and then prepared for permanent use. Cytological analysis was done under an optical microscope. A total of 2000 erythrocyte cells were examined per fish in coded slides. The presence of other nuclear abnormalities in erythrocytes (NAE) (segmented nucleus, lobate or in kidney shape) was also analyzed.

2.4 Statistical procedures

Results are expressed as means \pm standard deviations and were analyzed by Student t-test (parametric determinations). Data were considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

3. Results

Figure 1 shows the peripheral blood cells of *C. carpio* exposed to clomazone. It was possible to verify that the herbicide clomazone caused micronucleus formation, nuclear abnormalities in erythrocytes of fish when compared to control fish. Specimens exposed to 5.0 mg L^{-1} of clomazone showed significantly enhanced frequency of MN values (Table 2). However, the exposure to waterborne clomazone concentration did not significantly change the other NAE values when compared to control (Table 2). In addition, we observed a pronounced increase in the ID of fishes treated with the herbicide (Table 2).

Figure 2 depicts the DCFHDA oxidation in fish total blood of both groups, control and treated, with 5 mg L^{-1} of clomazone. Was observed a significant increase in the rate of DCFHDA oxidation in the total blood of fishes treated with clomazone when compared with control group, indicating that this herbicide enhance in the ROS production in the total blood of these fishes.

4. Discussion

Oxidative stress caused by excessive ROS is an important factor contributing to cell and tissue damage (Risso-de Faverney et al., 2004 and Shi et al., 2005). The literature suggests that ROS are continuously generated from environmental contaminants such as herbicides, heavy metals, and insecticides (Melchiorri et al., 1998; Risso-de Faverney et al., 2001; Ledirace et al., 2005, Liu et al., 2006). This is confirmed in our experiment where ROS production is indicated by DCFHDA oxidation generated by the production of intracellular H_2O_2 mainly in the mitochondria. Fig. 2 shows that treatment with clomazone significantly elevated the

level of DCFA oxidation, suggesting that clomazone induces ROS production. This probably indicates that oxidative stress is an important pathway of clomazone toxicity. Thus, we applied the comet assay to evaluate total DNA strand breaks in the erythrocytes of *C. carpio* exposed in vivo to 5.0 mg L⁻¹ of clomazone and we observed a pronounced increase in the DI of fishes treated with the herbicide (Table 2). The results of clomazone-induced DNA damage in erythrocytes (Table 2) are in agreement with a great number of studies showing ROS as major sources of DNA damage by causing strand breaks, removal of nucleotides, and a variety of modifications of the bases of the nucleotides (Cooke et al., 2003). ROS such as hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide anion (O₂⁻) and hydroxyl radical (OH⁻) at supranormal levels have been shown to produce extensive damage such as DNA strand breaks, enzyme inactivation, and even apoptosis (Peña-Llopis et al., 2003; Banudevi et al., 2006). Thus, it is possible that clomazone could induce alterations such as DNA damage or DNA stand breaks in *C. carpio* resulting in the formation of comets. It could be, this way, considered a pesticide with potential pre-mutagenic and genotoxic properties as reported by Kamman et al., 2001 and Frenzilli et al., 2000. The DNA damage detected in this study could have originated from DNA single-strand breaks, DNA double strand breaks, or by crosslinking DNA resulting from the interaction of pesticides or their metabolites with DNA (Fairbairn et al., 1995).

Some authors also report that pesticides induce the formation of MN in animals (Chauhan et al., 2000; Giri et al., 2002). Thus, the potential mutagenicity and genotoxicity of the herbicide clomazone were also verified and was found significantly higher a number the MN in the erythrocytes of the fish exposed to the herbicide when compared with the control group, indicating the mutagenic potential of this pesticide. This observation is consistent with the observations of an increased frequency of MN in the gill tissue *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted seawater (Scarpato et al., 1990). Nwani et al. (2010) found, in *Chana punctatus* exposed to the insecticide carbofuran, an increase of MN in erythrocytes of exposed fish, and this increase was more pronounced when the concentration and duration of exposure was higher. Other authors also reported an increased frequency of MN in fish exposed to different chemicals (Adbul-Farah et al., 2003; Cavas and Ergene-Gözükara, 2005; Oliveria et al., 2005).

Thus, considering our results we can conclude that high concentrations of the herbicide clomazone caused an increased production of ROS that probably resulted

in an increase in the DI and an elevated MN formation, demonstrating the genotoxic effects of this herbicide on this species of fish.

References

- Abdul-Farah, M., Ateeq, B., Ali, M.N., Ahmad, W., 2003. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by micronucleus test in fresh water fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 25–29.
- Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Venkatataman, P., Vignesh, C., Aruldas, M.M., Arunakaran, J., 2006. Role of α -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCP exposed male albino rats. *Food Chem. Toxicol.* 44, 2040–2046.
- Bretau, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotox. Environ. Saf.* 47, 117-124.
- Castagnolli, N., Cyrino, J.E.P. 1986. *Piscicultura nos trópicos*, ed. Manole LTDA. São Paulo, SP, Brasil, p. 152.
- Cavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271.
- Chauhan, L.K.S., Pant, N., Gupta, S.K., Srivastava, S.P., 2000. Induction of chromosome aberrations, micronucleus formation and sperm abnormalities in mouse following carbosulfan exposure. *Mutat. Res.* 465, 123–129.
- Cheung, V.V., Depledge, M.H., Jha, A.N., 2007. An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the comet assay. *Mar. Environ. Res.* 62, S301–S305.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.* 17, 1195–1214.
- Countryman, P.I., Heddle, J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41, 321-332.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Lazzari, R., Duarte, M.F., Morsch, V.M., Pippi, A.L., Vieira, V.P., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotox. Environ. Saf.* 65, 48- 55.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 399, 37–59.
- Fenech, M., 1993. The cytokinesis-block micronucleous technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* 285, 35-44.

- Fraga, C.G., Cavanagh, E., Carrasquedo, F., Lotito, S., Lucesoli, F., Oteiza, P.I., 1996. Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon, Manaus, p. 323–330.
- Frenzilli, G., Bosco, E., Barale, R., 2000. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutat. Res.* 35, 206–221.
- Giri, S., Giri, A., Sharma, G.D., Prasad, S.B., 2002. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. *Mutat. Res.* 519, 75–82.
- Hehls, S., Segner, H., 2001. Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-W1, using the comet assay. *Environ. Toxicol.* 16, 321–329.
- Kamman, M., Bunke, H., Steinhart, N., Theobald, A., 2001. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with comet assay. *Mutat. Res.* 498, 67–77.
- Kime, D.E., 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish* 5 (1), 52–96.
- Ledirace, N., Antherieu, S., d'Uby, A.D., Caron, J.C., Rahamani, R., 2005. Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.* 86, 444–452.
- Liu, Y., Zhang, Y., Liu, J., Huang, D., 2006. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetachlor-induced DNA damage on *Bufo-raddei* tadpole liver. *Aquat. Toxicol.* 78, 21–26.
- Melchiorri, D., Ortiz, G.G., Reiter, R.J., Sewerynek, E., Daniels, W.M., Pablos, M.I., Nistico, G., 1998. Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. *Toxicol. Lett.* 95, 103–108.
- Miron, D.S., Crestani, M., Schettinger, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno, M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotox. Environ. Saf.* 61, 398–403.
- Moraes, B.S., Loro, V.L., Gluszczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., Machado, S.O., 2007. Effect of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 68, 1597–1601.
- Nigro, M., Falleni, A., Barga, I.D., Scarcelli, V., Lucchesi, P., Regoli, F., Frenzilli, G., 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environment: transplanted versus native mussels. *Aquat. Toxicol.* 77, 339–347.

- Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., 2010. Mutagenic and genotoxic effects carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem. Toxicol.* 48, 202-208.
- Oliveria, A., Ramirez, B., Garcia, F.P., 2005. Genotoxic damage in Zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutagenesis* 20, 291–295.
- Pavlica, M., Klobucar, G.I., Velna, N., Erben, R., Papes, D., 2000. Detection of micronuclei in the haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail by the pesticide pentachlorophenol. *Mutat. Res.* 465, 145–150.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquat. Toxicol.* 65, 337–360.
- Phyu, Y.L., Warne, M.St.J., Lima, R.P., 2006. Toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to the freshwater fish (*Melanotenia fluviatilis*) under laboratory and simulated field conditions. *Sci. Total Environ.* 356, 86–99.
- Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B., Rahmani, R., 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat. Toxicol.* 53, 65–76.
- Risso-de Faverney, C., Orsini, N., De Sousa, G., Rahmani, R., 2004. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 69, 247–258.
- Rodrigues, N.R., Almeida, F.S., 1998. *Guia de Herbicidas*, fourth ed. Londrina, PR, Brasil, p. 461–466.
- Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 484-491.
- Santos, D.B., Schiar, V.P.P., Ribeiro, M.C.P., Schwab, R.S., Meinerz, D.F., Allebrandt, J., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Aschner, M., Barbosa, N.B.V., 2009. Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 676, 21–26.
- Scarpato, R., Migliore, L., Alfinito, C.G., Barale, R., 1990. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar. Pollut. Bull.* 21, 74–80.

- Sevgiler, Y., Oruc, E.O., Uner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pest. Biochem. Physiol.* 78, 1–8.
- Sharma, S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Pandey, S., Srivastava, S.K., Singh, P.J., Mathur, P.K., 2007. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 617–623.
- Shi, H.H., Wang, X.R., Luo, Y., Su, Y., 2005. Electron paramagnetic resonance evidence of hydroxyl radical generation and oxidative damage induced by tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 74, 365–371.
- Silva, L.B., Barcellos, L.J.G., Quevedo, R.M., Souza, S.M.G., Kreutz, L.C., Ritter, F., Finco, J.A., Bedin, A.C., 2006. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South America: Initial growing period. *Aquaculture* 255, 417–428.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 91, 175-184.
- Toni, C, Loro, V.L., Santi, A., Menezes, C.C., Cattaneo, R., Clasen, B.E., Zanella, R., 2011. Exposure to tebuconazol in Rice Field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 153, 128-132.
- Vandeputte, M., 2003. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. *Aquat. Living Resour.* 16, 399–407.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 13, 57–149.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 612–616.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisev, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo(a) pyrene 17alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–142.
- 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. *Chromatographia* 55, 573-577.

Figure Captions

Figure 1: *Cyprinus carpio* peripheral blood cells (AO, x1000) exposed during 7 days to clomazone. Cell with presence of micronuclei (arrow; A), normal cells (B), and nuclear abnormalities in mature erythrocytes – fragmenting nuclei (C).

Figure 2: Effects of herbicide clomazone (5.0 mg L^{-1}) on the ROS generation in total blood of *Cyprinus carpio*. The blood samples of control and clomazone fishes were incubated with DCFHDA ($20 \text{ } \mu\text{M}$) for 30 min. Data are expressed as mean \pm SEM (n=18) and were calculated through five independent assays. *Statistically different from control; (data were analyzed statistically by t-test, $P \leq 0.05$ was considered statistically significant).

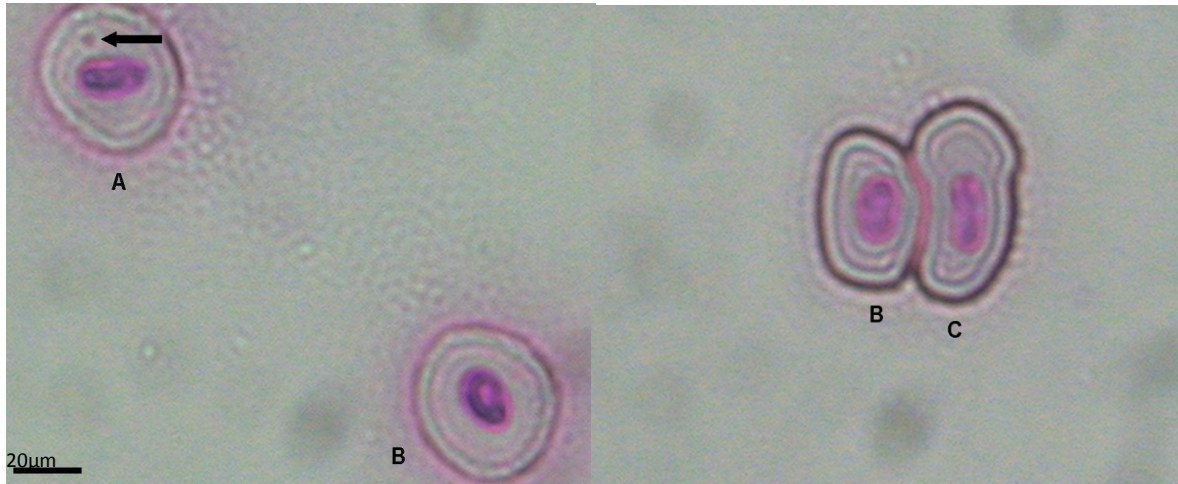


Figure 1: *Cyprinus carpio* peripheral blood cells (AO, x1000) exposed during 7 days to clomazone. Cell with presence of micronuclei (arrow; A), normal cells (B), and nuclear abnormalities in mature erythrocytes – fragmenting nuclei (C).

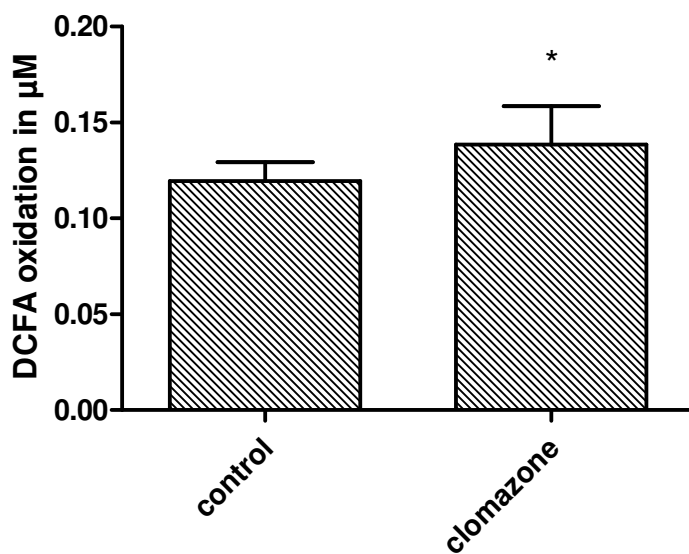


Figure 2: Effects of herbicide clomazone (5.0 mg L^{-1}) on the ROS generation in total blood of *Cyprinus carpio*. The blood samples of control and clomazone fishes were incubated with DCFHDA ($20 \text{ }\mu\text{M}$) for 30 min. Data are expressed as mean \pm SEM ($n=18$) and were calculated through five independent assays. *Statistically different from control; (data were analyzed statistically by t-test, $P \leq 0.05$ was considered statistically significant).

Table 1. Water parameters through the experiment

Clomazone Concentration (mg L ⁻¹)	pH	Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	Temperature (°C)	Nitrite (mg L ⁻¹)	Total ammonia (mg L ⁻¹)
0	8.12±0.01	9.20±0.03	24.0±0.1	0.01±0.00	0.02±0.01
5.0	8.15±0.00	8.33±0.02	23.7±0.0	0.04±0.01	0.02±0.00

n=3 for each tank; values are expressed as mean ± SD

Table 2. Micronuclei (MN) frequencies, nuclear abnormalities in erythrocytes (NAE) and damage index (DI) in erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to waterborne clomazone concentration (5.0 mg L⁻¹) for 7 days.

Experimental group	MN/2000 cells	NAE/2000 cells	DI
Controle	0.0	1.2±0.41	90.75±24.07
Clomazone	2.4±0.4*	1.5±0.34	175.75±25.43*

*Statistically significant compared to control (t-test, for Independent Samples by Variables, $P \leq 0.05$); Data are expressed as means for (n=18) independent experiments.

5 DISCUSSÃO

Devido ao crescente aumento da utilização de pesticidas, faz-se necessário, sob um ponto de vista ecotoxicológico, estabelecer os limites de tolerância de agrotóxicos amplamente utilizados em espécies como a carpa, que apresenta relevante valor comercial, sendo utilizada em sistemas de policultivo e de consórcio arroz-peixe. O teste de toxicidade aguda do herbicida clomazone para *Cyprinus carpio*, neste estudo determinou como CL₅₀ (96 h) a concentração de 30,35 mg/L com intervalo de confiança de 23,00 – 37,00 e índice de segurança de 43,36 mg/L. Ao comparar esses resultados com os achados da literatura tratando do mesmo herbicida, pode-se dizer que *C. carpio* é mais resistente ao clomazone que *Oncorhynchus mykiss* e *Rhamdia quelen*, que apresentaram valores menores para CL₅₀ (96 h) 19,00 e 7,32 mg/L respectivamente (VENCIL et al., 2002; MIRON et al., 2005). Comparando-se os valores de CL₅₀ (96 h) do clomazone com outras espécies de peixes, observou-se que as carpas quando expostas ao clomazone, possuem uma resistência similar a *Lepomis macrochirus* que tem uma CL₅₀ (96 h) para o clomazone de 34 mg/L (VENCIL et al., 2002) e a *Hyphessobrycon scholzei* que, segundo Jonsson et al. (1998) tem uma CL₅₀ (96 h) de 27,3 mg/L para esse herbicida. Além disso, o resultado da CL₅₀ (96h) encontrada nas condições deste estudo foi bem maior que a dose letal para 50% das carpas expostas ao clomazone na pesquisa realizada por Resgalla Jr et al. (2002), sendo esta de 9,76 mg/L de clomazone (19,52 mL/L da solução Gamit[®] 50%), com índice de segurança de 13,94. Esses resultados foram discrepantes provavelmente por diferenças nas condições experimentais, já que neste estudo foram utilizadas caixas de 45 L com 6 peixes por caixa, o que diferiu do estudo de Resgalla et al. (2002), que foi com caixas de 3L com 10 peixes por caixa, mostrando que a toxicidade de um pesticida sobre determinado organismo pode variar não só pela espécie de peixe analisada, como também pelas condições experimentais.

É importante ressaltar que o valor de CL₅₀ (96h) encontrado para o clomazone neste estudo, é maior do que as concentrações desse herbicida utilizadas no cultivo de arroz (0,4 a 0,7 mg/L) segundo, Rodrigues e Almeida (2005), demonstrando que há uma boa margem de segurança de utilização deste herbicida no campo. Esse

resultado está de acordo com o índice de segurança encontrado neste estudo (43,36 mg/L). Sendo que o índice de segurança para a clomazone foi calculado com base na maior concentração recomendada para a utilização desse herbicida em lavouras de arroz irrigado.

Durante o experimento para determinar a CL_{50} (96h), foi observado o comportamento das carpas expostas ao herbicida. Observou-se que os peixes expostos a 10 mg/L clomazone não apresentaram mudanças comportamentais relevantes quando comparados com o grupo controle. No entanto, as carpas expostas às concentrações mais elevadas, demonstraram natação errática, letargia, inchaço abdominal, resposta inadequada aos estímulos e nadavam sempre na superfície da água. A natação errática também foi relatada por Miron et al. (2005), quando expuseram jundiás a diferentes concentrações do herbicida clomazone por 96 horas.

Outro parâmetro utilizado para avaliar a toxicidade do clomazone foi a atividade da enzima acetilcolinesterase. Pois, segundo Moraes et al. (2007) a inibição ou ativação da enzima acetilcolinesterase pode afetar o processo de neurotransmissão colinérgica e promover efeitos indesejáveis nos peixes como nado errático e desorientação. Neste estudo, a atividade da enzima AChE foi avaliada nos peixes mortos e nos sobreviventes do teste de toxicidade, procurando-se relacionar com as observações comportamentais. O aumento da atividade observada no músculo dos peixes mortos (260,1%), expostos a 50 mg/L de clomazone, poderia ser responsável pela depleção de acetilcolina na fenda sináptica. No entanto, não encontramos uma explicação válida para essa mudança na atividade da AChE, mas é importante ressaltar que as observações dos peixes foram realizadas apenas duas vezes ao dia e não sabemos o momento exato da morte dos peixes. Em contrapartida, um aumento da atividade AChE também foi observado no músculo das carpas que sobreviveram à exposição a 10, 20 e 30 mg/L clomazone (143,7, 137,1 e 138,4%, respectivamente), o que causou uma diminuição do estímulo dos receptores nicotínicos musculares pela ACh e com isso provavelmente, pode ter ajudado a evitar a morte dos peixes expostos a essas concentrações do herbicida. Este último resultado é consistente com a atividade muscular aumentada da AChE em *Leporinus obtusidens* expostas a 0,5 mg/L de clomazone encontrada por Moraes et al. (2007). Os resultados obtidos no músculo estão discordando de alguns relatos da literatura. Roex et al. (2003) demonstraram que devido à inibição da atividade da

AChE, o neurotransmissor ACh, aumenta nas fendas sinápticas. O aumento do neurotransmissor pode causar uma super-estimulação dos receptores nicotínicos, o que pode afetar o crescimento, a sobrevivência, a alimentação e o comportamento reprodutivo dos peixes expostos a diferentes poluentes.

A atividade enzimática da AChE no cérebro foi inibida em todas as concentrações em que havia carpas sobreviventes (10, 20 e 30 mg/L), sendo essas inibições de 44,3, 42,7 e 35,5%, respectivamente. Esta inibição da atividade da enzima AChE é um relato comum na literatura. Inibição de 47% e 45% na atividade da enzima AChE cerebral e muscular foi observada em jundiás expostos a 0,5 e 1,0 mg/L de clomazone (CRESTANI et al., 2007). Neste estudo, as carpas comuns expostas a 30 e 40 mg/L de clomazone não mostraram nenhuma mudança significativa na atividade cerebral da AChE muscular após o óbito, podendo ter ocorrido um mecanismo compensatório que normalizou a atividade desta enzima. Contudo, é importante ressaltar que a observação do comportamento dos peixes foi realizada somente duas vezes ao dia e não se sabe o exato momento de morte ou de agonia dos peixes.

Na segunda parte do estudo, foi investigada a ocorrência de estresse oxidativo nas carpas expostas a 0,5 mg/L de clomazone, em campo (lavoura de arroz) por 7, 30 e 90 dias, como também em laboratório por um período de 7 dias. Foram avaliados parâmetros oxidativos, como TBARS e proteínas carboniladas, como também a atividade das enzimas antioxidantes GST e CAT. Nestes experimentos, foi observado que após 7 dias de exposição a campo, os níveis de TBARS aumentaram no fígado e no cérebro. Isik e Celik (2008) encontraram resultados que corroboram aos desta investigação. Estes autores observaram aumento dos níveis de TBARS em fígado de *Oncorhynchus mykiss* expostos a 0,5 ppm dos inseticidas diazinon e metil paration, durante 72 horas. Em experimentos de campo em condições semelhantes às deste estudo, Toni et al. (2010) também encontraram elevação dos níveis de TBARS em cérebro de *C. carpio* após 7 dias de exposição ao herbicida bispiribac-sódio, como também Cattaneo et al. (2011) e Toni et al. (2011) observaram aumento da peroxidação lipídica no cérebro e fígado de carpas expostas por 7 dias ao herbicida penoxsulam e tebuconazole respectivamente, em lavoura de arroz. O fenômeno de LPO pode estar ocorrendo como consequência de um aumento na produção de EROs, que superou a capacidade do sistema de defesa antioxidante em neutralizá-las,

resultando na situação conhecida como estresse oxidativo.

No entanto, neste estudo os níveis de TBARS muscular não tiveram alteração significativa após 7 dias de exposição a campo, o que difere de outros estudos (MONTEIRO et al., 2006; ORUÇ; USTA 2007) onde foi observado um aumento da quantidade de TBARS no músculo de *Brycon cephalus* expostos por 96 horas a 2 mg/L de metil paration e de *C. carpio* expostos a diferentes concentrações de diazinon durante 5 dias. Como também contraria os resultados encontrados por Cattaneo et al. (2011) e Toni et al. (2011), que encontraram aumento da LPO no músculo de *Cyprinus carpio* expostas ao penoxsulam e tebuconazole respectivamente, em condições de lavoura de arroz após exposição de 7 dias.

Seguindo o experimento de avaliação do estresse oxidativo, foi avaliada a formação de proteínas carboniladas, que segundo Parvez e Raisuddin (2005) são produzidas em função de um aumento na quantidade de radicais hidroxilas, uma ERO gerada durante o processo que leva ao estresse oxidativo. Além disso, isso pode estar relacionado com o aumento da LPO que levaria ao ataque de proteínas próximas causando a formação de um excesso de proteína carbonil, conforme Almroth et al. (2005) sugerem. No entanto, após exposição de 7 dias a campo, foi verificado que as carpas expostas não mostraram uma mudança significativa na quantidade de proteínas carboniladas no fígado. O que por sua vez, corrobora com o resultado encontrado por Toni et al. (2010) em exposição de *C. carpio* ao herbicida bisprirac-sodium por 7 dias em lavoura de arroz, mostrando que provavelmente em 7 dias já tenha acontecido o estresse oxidativo, mas ainda não tenha causado significativas alterações nas proteínas hepáticas.

A GST foi outra enzima relacionada ao sistema antioxidante que foi avaliada, por estar diretamente envolvida no processo de detoxificação, sendo importante protetora contra os efeitos de diferentes agentes tóxicos, ao catalisar a conjugação da glutatona a uma grande variedade de xenobióticos, favorecendo a eliminação desses compostos, conforme descreve Ferrari et al. (2007), Menezes et al. (2011), em seus estudos. No entanto, nos experimentos realizados neste estudo, a atividade dessa enzima não foi alterada em 7 dias de exposição a campo. Isso mostra que em 7 dias o estresse oxidativo provavelmente não foi grande o suficiente para alterar todas as enzimas antioxidantes que o corpo lança mão em uma situação de estresse oxidativo.

Além disso, neste mesmo estudo foi verificada a atividade de mais uma enzima antioxidante, a CAT hepática dos peixes que mostrou estar diminuída em 7 dias de

exposição a campo. Esse resultado diferente do que normalmente é relatado em exposições de carpas, a outros pesticidas, por 7 dias em lavoura de arroz, em que os peixes não mostram alterações significativas na atividade da CAT (TONI et al., 2010; CATTANEO et al., 2011). Mostrando que em situações de estresse oxidativo induzido por pesticidas, o tipo de agrotóxicos a que os peixes são expostos pode influenciar na resposta sobre a atividade de uma enzima.

No experimento de 7 dias em laboratório, o TBARS do cérebro, fígado e músculo mostrou-se aumentado. O que está de acordo com os resultados encontrados para o tecido hepático e muscular de carpas expostas ao tebuconazole nas mesmas condições de laboratório em um período também de 7 dias (TONI et al., 2011). No fígado, os níveis de proteínas carboniladas diminuíram, enquanto aumentou a atividade da CAT. De acordo com alguns investigadores, os níveis diminuídos de proteínas carbonilas podem indicar que a suscetibilidade à degradação de proteínas pode ter aumentado pela oxidação de proteínas (ALMROTH et al., 2005). Parvez et al. (2006) também encontraram diminuição dos níveis de proteínas carboniladas no fígado, rim e brânquias de *Wallago attu* expostos a diversos poluentes no rio Yamuna.

Esses resultados mostraram uma resposta típica de peixes contra a toxicidade do herbicida, que seria o aumento da atividade da CAT no fígado, o que provavelmente ocorreu em resposta a um provável aumento das EROs no tecido hepático em decorrência do estresse oxidativo que estava acontecendo nas carpas expostas ao clomazone. Além disso, podemos relacionar o aumento da atividade da CAT no fígado à elevação dos TBARS no mesmo tecido, indicando que, mesmo ocorrendo um aumento da atividade da CAT, houve um significativo aumento de peroxidação lipídica nos hepatócitos. Uma elevação significativa da atividade da CAT também foi observada em alguns estudos após a exposição a diferentes poluentes e pesticidas (ZHANG et al., 2004; PEIXOTO et al., 2006; MORAES et al., 2007). Com relação à enzima GST, foi observado que o mesmo resultado tanto a campo quanto em laboratório, em que não foi observado uma significativa alteração na atividade da enzima GST após 7 dias de exposição, conforme resultado encontrado por Moraes et al. (2007) em experimento semelhante com piavas.

Após 30 dias de exposição em condições de campo, os níveis de TBARS aumentaram no músculo, enquanto os níveis de TBARS diminuíram no tecido cerebral. Já no tecido hepático não foram registradas alterações para esse

parâmetro. Segundo Oruç e Usta (2007), a peroxidação lipídica é um dos principais processos induzidos por estresse oxidativo sendo considerado um indicador valioso de dano oxidativo em componentes celulares. Dessa maneira, os resultados encontrados neste estudo sugerem que os níveis aumentados de TBARS no músculo das carpas, encontrados após exposição ao clomazone indica a ocorrência de estresse oxidativo nesse tecido, mostrando que as defesas antioxidantes não foram totalmente capazes de neutralizar as EROs produzidas na exposição ao herbicida, levando assim a LPO. Este aumento da peroxidação lipídica muscular também foi relado por Toni et al. (2010) em estudo semelhante de 21 dias com carpas expostas ao herbicida bispiribac-sodium.

Durante este mesmo período, os níveis de proteína carboniladas foram aumentados, o que podem estar ligados ao aumento dos níveis de TBARS, devido à formação de ROS, que por sua vez poderia atacar diretamente proteína e lipídeos, interrompendo o metabolismo lipídico e proteico conforme afirma Almroth et al. (2005), levando à formação de proteínas carboniladas e TBARS. Esta conclusão foi também considerada por outros investigadores (BAINY et al., 1996). Além disso, os resultados encontrados estão de acordo com os de Parvez e Raisuddin (2005), que observaram níveis de proteínas carbonilas aumentados em peixes (*Channa punctata*) expostos a diferentes pesticidas e como também corroboram com os resultados encontrados por Toni et al. (2010) e Cattaneo et al. (2011) em suas pesquisas com *Cyprinus carpio*.

Após 30 e 90 dias de exposição ao clomazone, também foi avaliada a enzima GST que permaneceu inibida no tecido hepático de *C. Carpio*. Esta diminuição da atividade da glutathione S-transferase durante este período de exposição pode sugerir uma falha de desintoxicação e a ocorrência de estresse oxidativo. A indução de GST nos tecidos dos peixes é considerada benéfica para lidar com uma condição de estresse. No entanto, a redução de tal atividade é pouco conhecida. A inibição da atividade de GST no tecido hepático pode ocorrer porque o fígado é um dos primeiros órgãos expostos aos efeitos tóxicos. Este resultado está de acordo com a de Ballesteros et al. (2009), que observou diminuição da GST nas brânquias, fígado e músculo de *Jenynsia multidentata* expostos ao endossulfan, e com a de Menezes et al. (2011) que encontraram diminuição da GST no fígado de *R. quelen* expostos ao Roundup®.

Nesta segunda parte do estudo, também foram realizadas análises de

estresse oxidativo após 90 dias de exposição e constatou-se que os níveis de TBARS aumentaram no cérebro como também no tecido muscular, indicando que uma condição de estresse permaneceu nesta espécie de peixe após exposição a longo prazo. Já no tecido hepático, as carpas não tiveram alteração nos níveis de TBARS. As proteínas carbonilas aumentaram no fígado, o que provavelmente ocorreu devido ao estresse oxidativo, que frequentemente ocorre em exposição a longo prazo a pesticidas agrícolas, mostrando que este parâmetro também serve como um bom biomarcador para o estresse oxidativo, especialmente no contexto de contaminação ambiental a longo prazo. O aumento da LPO cerebral, juntamente com a carbonilação de proteínas hepática, foi relatado em outras pesquisas, com esta mesma espécie de peixe expostas a 72 dias a outros pesticidas (TONI et al., 2010; CATTANEO et al., 2011). Já a atividade da enzima CAT foi significativamente diminuída no fígado de peixes expostos à clomazone por 90 dias.

A atividade significativamente diminuída da enzima CAT no fígado das carpas expostas por 90 dias a campo, está de acordo com os resultados de Dorval e Hontela (2003) e Ballesteros et al. (2009) que encontraram atividade diminuída da CAT no fígado de *Oncorhynchus mykiss* e *Jenynsia multidentata* após exposição ao inseticida endossulfan. Além disso, esses resultados sobre o estresse oxidativo e parâmetros antioxidantes poderiam estar relacionados aos efeitos cumulativos de clomazone, visto que o herbicida foi detectado na água do arrozal apenas até os 14 dias após a aplicação, enquanto que alguns efeitos apareceram após uma exposição prolongada (30 e 90 dias). Assim, a possibilidade desse pesticida ou de algum metabólito derivado da metabolização deste, permanecer nos tecidos dos peixes causando danos oxidativos, é uma conclusão aceitável.

Sabendo a importância da investigação de possíveis alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase durante um processo de intoxicação a produtos químicos, foi realizada a determinação da atividade dessa enzima, neste segundo experimento a campo (lavoura de arroz) por 7, 30 e 90 dias, como também em laboratório por 7 dias. Foi constatado que, após 7 dias de exposição em condições de campo, a atividade da AChE não foi alterada no cérebro, nem no músculo em comparação com os controles. Já, em condições de laboratório, a enzima AChE foi inibida significativamente, no músculo das carpas. Não houve significativas alterações no tecido cerebral. Crestani et al. (2007) em pesquisas sob condições de laboratório também evidenciaram que o clomazone é um potente inibidor da AChE

cerebral e muscular de *R. quelen*, atingindo um máximo de inibição de 45 e 47% em concentrações de 0,5 ou 1,0 mg/L, respectivamente. Outro estudo indicou que as concentrações de 5, 10 ou 20 mg/L de uma formulação comercial de clomazone, também sob condições de laboratório, causaram a inibição da atividade enzima AChE no cérebro e músculo de jundiás, após 96 horas de exposição (MIRON et al., 2005).

Assim, os resultados deste estudo mostraram que a carpa, em comparação com outras espécies de peixes, parecem ser mais resistentes à interrupção de atividade AChE quando expostas ao clomazone em condições de campo. Além disso, as concentrações deste herbicida usadas em campos de arroz, que segundo Rodrigues e Almeida (2005) estão entre 0,4 – 0,7 mg/L, não seriam suficientes para causar mudanças da AChE cerebral e muscular.

Após 30 e 90 dias de exposição, a atividade da AChE não apresentou alteração no cérebro e músculo em condições de campo. A ausência de efeitos encontrados neste estudo, principalmente no campo, pode indicar que o cérebro e o músculo de carpas não foram afetados pela quantidade desta formulação comercial contendo clomazone administrada nas lavouras de arroz. No entanto, em outro experimento em lavoura de arroz, uma exposição de 30 dias de *L. obtusidens* ao clomazone (0,5 mg/L) causou inibição da atividade da AChE no cérebro, bem como o aumento da atividade da AChE no músculo (MORAES et al., 2007). Já em outro estudo com clomazone e *L. obtusidens* com 90 dias de exposição, os peixes demonstraram diminuição da atividade AChE em ambos os tecidos (cérebro e músculo) (MORAES et al., 2009). Assim, levando em consideração esses diferentes resultados, torna-se de suma importância, a realização de mais estudos com diferentes espécies de peixes, para a compreensão da inibição da atividade da enzima AChE pelo herbicida clomazone.

Dando sequência a este estudo, foram investigadas possíveis alterações metabólicas nas carpas expostas ao herbicida clomazone, tanto a campo (7, 30 e 90 dias), como em laboratório por 7 dias. Em uma situação de estresse, geralmente pelo aumento das necessidades energéticas, o glicogênio mostra-se diminuído em peixes. No presente estudo, após 7 dias de exposição a campo, o glicogênio do fígado e do tecido muscular mostraram-se aumentados. O que juntamente com o aumento da glicose muscular e sanguínea nos peixes expostos por 7 dias nas mesmas condições, sugere que em um primeiro momento as carpas expostas a

campo, podem ter estimulado um aumento da liberação de hormônios relacionados com o metabolismo dos carboidratos, como por exemplo, do cortisol, um hormônio liberado pelo cortex adrenal em situações de estresse e que aumenta a síntese de glicogênio e glicose para suprir futuras necessidades energéticas as quais podem ocorrer durante o estresse oxidativo que estava ocorrendo.

Vindo ao encontro dos resultados obtidos neste estudo Moraes et al. (2011), relataram um significativo aumento do glicogênio muscular de carpas expostas a um herbicida contendo imazethapyr e imazapic, após 7 e 30 dias de exposição em condições de lavoura de arroz, confirmando a hipótese relatada acima da ocorrência de estresse oxidativo nos peixes expostos a campo.

Essa hipótese proposta pode ter ocorrido também na exposição a 7 dias em laboratório; no entanto, com algumas mudanças, conforme os resultados encontrados que foram de aumento do glicogênio hepático e muscular, diminuição da glicose muscular e a elevação da glicemia. Essas diferenças entre a exposição a campo e a laboratório ocorrem provavelmente devido a algumas condições experimentais, tais como as alterações climáticas, que podem interferir com o metabolismo dos peixes o que não ocorre no laboratório, onde as condições experimentais são controladas.

Outros parâmetros avaliados foram o lactato, as proteínas, os aminoácidos e a amônia em tecidos das carpas expostas à formulação comercial de clomazone. Sob condições de lavoura de arroz por 7 dias, não foram observadas alterações nos níveis de lactato no tecido hepático. No entanto, no músculo estavam aumentados neste mesmo período, indicando metabolismo anaeróbico pelo aumento do lactato neste tecido, como forma de obter energia e ao mesmo tempo manter as reservas de glicose como glicogênio no fígado e músculo. Igualmente em condições de laboratório, o lactato do tecido hepático esteve elevado após 7 dias de experimento, no entanto, nenhuma alteração significativa no músculo foi observada. Esses resultados ocorrem provavelmente em virtude dos peixes estarem tentando eliminar o xenobiótico e reverter a situação de estresse em que se encontram. De acordo com Gluszczak et al. (2006) o aumento do lactato também indica um distúrbio metabólico e uma resposta clara contra a depleção de energia.

Com relação aos níveis de proteína no fígado, estes foram aumentados após 7 dias de exposição, diminuíram após 30 dias, e não se alteraram após 90 dias de exposição ao clomazone em condições lavoura de arroz. A proteína muscular não

mostrou nenhuma mudança durante todo o experimento, nestas mesmas condições. Também não houve alterações nos níveis de proteínas, nos mesmos tecidos sob condições de laboratório. Essas variações nos níveis das proteínas do fígado também podem indicar a ocorrência de estresse oxidativo causado pela exposição ao herbicida, o qual pode ter causado uma variação significativa na demanda de energia dos peixes diretamente relacionada ao tempo de exposição e às condições do experimento. Estes resultados também foram encontrados por Crestani et al. (2006) que observou um aumento dos níveis das proteínas hepáticas em *R. quelen* expostas ao clomazone por 192 horas.

Após 7 dias de exposição a campo, a quantidade de amônia no fígado foi aumentada, mas não se alterou no músculo. Entretanto, nas carpas submetidas ao experimento em laboratório, a quantidade de amônia foi inalterada no fígado e aumentada no tecido muscular. Juntamente com isso, foi observado que nas duas condições experimentais, os níveis de aminoácidos diminuíram no músculo das carpas após 7 dias de exposição, provavelmente por terem sido utilizados como fonte energética na situação de estresse que as carpas se encontravam e/ou terem sido utilizados como precursores metabólicos para a gliconeogênese, o que refletiu em um aumento da glicemia nos 7 dias de exposição tanto em laboratório, quanto em condições de lavoura de arroz. Com o aumento da quebra de aminoácidos muscular, a amônia deveria estar aumentada já que estava sob condições de laboratório; entretanto, a campo a amônia estava normal, provavelmente por ter sido convertida à uréia, pelo ciclo da uréia, que ocorre em peixes em períodos de jejum (WALSH et al., 1990); desidratação e alcalinidade da água (POLEZ et al., 2003), stress (HOPKINS et al., 1995) e concentração externa elevadas de amônia (SAHA; RATHA, 1994).

Conforme já relatado anteriormente, as alterações plasmáticas dos metabólitos também foram pesquisadas neste experimento a campo e em laboratório, onde foi encontrada uma diminuição da proteína em 7 dias de experimento em laboratório, como também em 7 e 90 dias de exposição a campo, provavelmente pelo aumento do uso de proteína como fonte de energia e para o aumento da gliconeogênese. Além disso, o lactato diminuído no plasma dos peixes expostos em condições de campo está diretamente relacionado à drenagem hepática de lactato para manter a gliconeogênese hepática. Por fim, em 7 dias de exposição podemos observar que o alto nível de glicose encontrado nas duas

condições experimentais, pode ser considerado um indicador secundário de estresse.

O glicogênio inalterado no fígado e no músculo em 30 dias de exposição, juntamente com a diminuição dos níveis de lactato, das proteínas e amônias no fígado, diminuição da glicose muscular e o aumento da concentração de glicose e do lactato plasmáticos neste mesmo período, podem indicar maior adaptação dos peixes, com ocorrência do chamado ciclo de cori (glicose-lactato-glicose) que ocorre por cooperação metabólica entre o músculo e o fígado em uma situação de privação de oxigênio (NELSON; COX, 2011)

O aumento dos níveis de glicogênio e diminuição dos níveis de amônia hepática observado em 90 dias de exposição poderia indicar que os peixes diminuíram seu consumo de fontes de carboidratos e proteínas do fígado. No entanto, a diminuição dos níveis de aminoácidos musculares e a diminuição das proteínas plasmáticas, juntamente com a situação hiperglicêmica que os peixes se encontravam após este período de exposição, mostram uma grande oxidação de proteínas como fonte de glicose e energia, em resposta à intoxicação crônica causada pelo herbicida clomazone. Assim, podemos considerar que o clomazone é um disruptor metabólico por interferir na ação de alguns cofatores enzimáticos ou se ligando a enzimas essenciais para a manutenção do metabolismo. Portanto, o monitoramento das respostas adotadas pelos peixes devido a essa toxicidade do clomazone, serve como biomarcadores de toxicidade a este tipo de pesticida agrícola.

Conforme alguns autores sugerem, as EROs são continuamente geradas a partir de contaminantes ambientais, tais como herbicidas, metais pesados e inseticidas (MELCHIORRI et al., 1998; RISSO-DE FAVERNEY et al., 2001; LEDIRACE et al., 2005, LIU et al., 2006), assim, em um terceiro experimento foi investigada a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) para confirmar a ocorrência de estresse oxidativo em carpas expostas a 5,0 mg/L de clomazone. No qual os resultados mostraram um aumento significativo das espécies reativas de oxigênio (EROs) no grupo de peixes expostos ao clomazone com relação ao grupo controle, indicado pela oxidação de DCFHDA (2,7- diacetato diclorofluorescência), que é gerado pela produção de H_2O_2 intracelular, principalmente nas mitocôndrias.

Além disso, como vários estudos mostram que o estresse oxidativo causado por excesso de EROs é um fator importante que contribui para danificar células e

tecidos (RISSO-DE FAVERNEY et al., 2004; SHI et al., 2005), foi realizado neste terceiro experimento o teste do cometa para, verificar a genotoxicidade causada pelas espécies reativas de oxigênio formadas pela exposição ao clomazone, onde foi observado que esse herbicida induziu um significativo dano ao DNA nos eritrócitos das carpas, provavelmente em função das EROs poderem promover rupturas dos filamentos, remoção de nucleotídeos e uma variedade de modificações das bases dos nucleotídeos (FAIRBRAIRN et al., 1995). Assim, é possível dizer que clomazone causa alterações no DNA de *C. carpio* resultando na formação de cometas. Sendo importante ressaltar que o dano ao DNA detectado neste estudo pode ser considerado um tipo de lesão potencialmente pré-mutagênica (KAMMAN et al., 2001) e a produção de quebras no DNA está relacionada, com propriedades mutagênicas e genotóxicas do pesticida (FRENZILLI et al., 2000).

Costa e Costa (2007) relatam que, dentro de anormalidades típicas, é possível observar vários tipos de núcleos que correspondem a brotamento ou fragmentação nuclear. Esses núcleos de brotamento podem ser os primeiros estágios na formação de micronúcleos, enquanto que a fragmentação pode originar células polinucleadas. Além disso, muitos autores relatam que pesticidas induzem a formação de MN em animais (CHAUHAN et al., 2000; GIRI et al., 2002). Assim, o potencial de mutagenicidade e genotoxicidade do herbicida clomazone também pôde ser verificado pelos resultados significativamente diferentes do teste de micronúcleo (MN) nos eritrócitos dos peixes, os quais foram significativamente maiores no grupo exposto ao herbicida quando comparado com o grupo controle, indicando o potencial mutagênico desse pesticida. Essa observação está de acordo com as observações de uma frequência aumentada de MN no tecido branquial dos *Mytilus galloprovincialis* expostas à água do mar poluído (SCARPATO et al., 1990). Nwani et al. (2010), observaram que *Channa punctatus* expostos ao inseticida carbofuran aumentaram MN em eritrócitos de peixes expostos, sendo que essa elevação foi mais pronunciada quando a concentração e a duração da exposição foi maior. Outros autores também relataram aumento da frequência de MN em peixes expostos a diferentes produtos químicos (ABDUL-FARAH et al., 2003; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; OLIVERIA et al., 2005).

Portanto, considerando os resultados encontrados, podemos concluir que:

6 CONCLUSÕES

- A CL_{50-96h} foi determinada em 30,35 mg/L com intervalo de segurança de 23 a 37 mg/L.
- Na exposição por 96h às mais altas concentrações provocaram alterações comportamentais como letargia, nado errático, nado próximo à superfície e perda de resposta a estímulos.
- A exposição por 96h às concentrações de 10, 20 e 30 mg/L de clomazone provocaram aumento da atividade da AChE em músculo, enquanto as mesmas concentrações provocaram diminuição da AChE em cérebro de carpas húngaras.
- A exposição ao clomazone provoca aumento da atividade da enzima GST no fígado após 7 dias de exposição em condições de laboratório, enquanto provoca inibição dessa atividade aos 7 e 90 dias em condições de campo.
- A exposição ao clomazone não altera a atividade da CAT no fígado após 7 dias de exposição em condições de laboratório, enquanto provoca inibição desta atividade aos 30 e 90 dias em condições de campo.
- Em condições de campo, não foram verificadas alterações na atividade da AChE, enquanto em condições de laboratório houve inibição da atividade da AChE em músculo de carpas expostas por 7 dias ao clomazone.
- Tanto em condições de campo, quanto de laboratório foram verificadas alterações na geração de TBARS em todos os tempos, exceto em fígado nos tempos 30 e 90 dias e em músculo no tempo 7 dias.
- A exposição ao clomazone diminuiu a formação de proteínas carboniladas no fígado após 7 dias de exposição em condições de laboratório, enquanto provoca aumento dessa produção aos 30 e 90 dias em condições de campo.
- Sobre condições de laboratório e campo, diversos dos parâmetros metabólicos sofreram alterações provocadas pela exposição ao clomazone.
- A exposição por 7 dias a 10 vezes a concentração utilizada de clomazone no campo aumentou a geração de EROS, além de aumentar o índice de dano e a formação de micronúcleo nos eritrócitos das carpas.

7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os promissores resultados obtidos nesta tese, poderíamos aprofundar ainda mais os estudos relacionados ao aspecto toxicológico desse herbicida. Assim, poderíamos realizar estudos a partir da concretização dos seguintes objetivos:

- Verificar a presença de resíduos do herbicida clomazone no músculo dos peixes.
- Verificar o comportamento dos peixes expostos ao clomazone, com metodologia comportamental que monitore e analise os peixes durante todo o experimento.
- Verificar alterações hormonais em carpas expostas ao clomazone, que podem ser biomarcadores de estresse.
- Realizar mais estudos, com diferentes espécies de peixes, para a compreensão da inibição da atividade da enzima AChE pelo herbicida clomazone.
- Analisar outros parâmetros enzimáticos e não-enzimáticos de estresse oxidativo nesta espécie de peixe.
- Comparar a toxicidade das diferentes formulações do herbicida clomazone comercializadas atualmente, utilizando concentrações de relevância ambiental.
- Verificar se o herbicida clomazone é genotóxico para carpas, quando utilizado nas concentrações recomendadas para o cultivo do arroz irrigado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-FARAH, M.; ATEEQ, B.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by micronucleus test in fresh water fish *Channa punctatus* (Bloch). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 25–29, 2003.

AGUIAR, L.H.; MORAES, G.; AVILEZ, I.M.; ALTRAN, A.E.; CORRÊA, C.F. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research**, v. 95, p. 224-230, 2004.

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H.S.; JAIN, S.K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. 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.

ALMEIDA, J. A.; NOVELLI, E. L. B.; DAL PAI SILVA, M.; ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilápia, *Oreochromis niloticus*. **Environmental Pollution**, v. 114, p. 169-175, 2001.

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

ALY, N.; EL-GENDY, K.; MAHMOUD, F.; EL-SEBAE, A.K. Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 7-12, 2010.

ALI, D.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to fresh water fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Chemosphere**, v. 71, p. 1823–1831, 2008.

ALI, D.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; LAKRA, W.S. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in fresh water fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 650–656, 2009.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 10 fev. 2011.

ATEEQ, B.; ABUL-FARAH, M.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, v. 518, p. 135–144, 2002.

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; AHMAD, W. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 348–354, 2005.

BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, p. 151-162, 1996.

BALDISSEROTTO, B. Freshwater fish culture in Rio Grande do Sul State: actual situation, problems and future perspectives. **Ciência Rural**, v. 39, p. 291-299, 2008.

BALLESTEROS, M.L.; WUNDERLIN, D.A.; BISTONI, M.A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 199-205, 2009.

BANU, S.B.; DANADEVI, K.; RAHMAN, M.F.; AHUJA, Y.R.; JAMIL, K. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 361–366, 2001.

BANUDEVI, S.; KRISHNAMOORTHY, G.; VENKATATAMAN, P.; VIGNESH, C.; ARULDHAS, M.M.; ARUNAKARAN, J. Role of α -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCP exposed male albino rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 2040–2046, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

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.

BOMBAIL, V.; DENNIS, A.W.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland, **Chemosphere**, v. 44, p. 383–392, 2001

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Legislação federal de agrotóxicos e afins**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, p.7-13, 1998.

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.

BUSCHINI, A.; CARBONI, P.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. **Mutation Research**, v. 537, p. 81-92, 2003.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E.P. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Manole, p. 152, 1986.

CATTANI, O.; SERRA, R.; ISANI, G.; RAGGI, G.; CORTESI, P.; CARPENE, E. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 113, p. 193-199, 1996.

CATTANEO, R.; LORO, V.L.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, F.A.; LUZ, L.; MIRON, D.S.; FONSECA, M.B.; MORAES, B.S.; CLASEN, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, p. 133-137, 2008.

CATTANEO, R.; CLASEN, B.; LORO, V.L.; MENEZES, C.C.; MORAES, B.S.; SANTI, A.; TONI, C.; AVILA, L.A.; ZANELLA, Z. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to the herbicide penoxsulam at rice field condition. **Journal of Applied Toxicology**, IN PRESS, DOI 10.1002/jat.1606, 2011.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264-271, 2005.

ÇAVAS, T., GARANKO, N.N., ARKHIPEHUK, V.V. Induction of micronucleus and binuclei in blood, gill and liver cells sub-chronically exposed to Cadmium chloride and Copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574, 2005.

CERICATO, L.; NETO, J.G.M.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; FINCO, J.; ROSA, J.G.S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; ANZILIERO, D.; BARCELLOS, L.J.G. Cortisol response to acute stress in jundiá

Rhamdia quelen acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 148, p. 281-286, 2008.

CEROÍN, J.J.; FERRANDO, M.D.; SANCHO, E.; GUTIERREZ-PANIZO, C.; ANDREU-MOLINER, E. Diazinon Exposure on Cholinesterase Activity in Different Tissues of European Eel (*Anguilla anguilla*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 35, p. 222-225, 1996.

CHAUHAN, L.K.S.; PANT, N.; GUPTA, S.K.; SRIVASTAVA, S.P. Induction of chromosome aberrations, micronucleus formation and sperm abnormalities in mouse following carbosulfan exposure. **Mutation Research** v. 465, p. 123–129, 2000.

CHEUNG, V.V.; DEPLEDGE, M.H.; JHA, A.N. An evaluation of the relative sensitivity of two marine bivalve mollusc species using the comet assay. **Marine Environmental Research**, v. 62, p. S301–S305, 2007.

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 - Part C**, v. 127, p. 233-242, 2000.

CHRISTOFFOLETI, P.J.; OVEJERO, R.F.L.; CARVALHO, J.C. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**, 2ª ed. Campinas: HRAC-BR, p. 100, 2004.

CIT-RS – CENTRO DE INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: <<http://www.cit.rs.gov.br>> Acesso em: 26 ago. 2011.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 141-152, 2001.

COLBY, S.R.; LYM, R.G.; HILL, E.R.; MC AVOY, W.J.; KITCHEN, L.M.; PRASAD, R. **Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America**, 6 ed., Illinois, p. 65–66, 1989.

COSTA, P.M.; COSTA, M.H. Genotoxicity assessment in fish peripheral blood: a method for a more efficient analysis of micronuclei. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 148-151, 2007.

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

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

DAMS, R.I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, p. 37-44, 2006.

DEGUCHI, Y.; TOYOIZUMI, T.; MASUDA, S.; YASUHARA, A.; MOHRI, S.; YAMADA, M.; INOUE, Y.; KINAE, N. Evaluation of mutagenic activities of leachates in landfill sites by micronucleus test and comet assay using goldfish. **Mutation Research**, v. 627, p. 178–185, 2007.

DE SMET, H.; BLUST, R. Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 48, p. 255-262, 2001.

DEZFULI, B.S.; GIARI, L.; SIMONI, E.; PALAZZI, D.; MANERA, M. Alteration of rodlet cells in chub caused by the herbicide Stam[®] M-4 (Propanil). **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 232-239, 2003.

DORVAL, J.; HONTELA, A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 92 p. 191-200, 2003.

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.

FAIRBRAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 399, p. 37–59, 1995.

FERNÁNDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.72, p.55-63, 2002.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.; PECHE´N DE D'ANGELO, A.M. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88 p. 134–142, 2007.

FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; DEO RIBEIRO, C.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb 11) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **General Molecular Biology**, v. 27, p. 103–107, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43 (1), p. 61-68, 1997.

FERREIRA, D.; MOTTA, A.C.; KREUTZ, L.C.; TONI, C.; LORO, V.L.; BARCELLOS, L.J.G. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. **Chemosphere**, v. 79, p. 914-921, 2010.

FONSECA, M.B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B.S.; MENEZES, C.C.; PRETTO, A.; TIerno, M.A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F.F.; LORO, V.L. 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 416-420, 2008.

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutation Research**, v. 35, p. 206–221, 2000.

GALLI, L.F.; TORLONI, C.E.C. **Criação de Peixes**. São Paulo, Nobel, p. 119, 1989.

GIRI, S.; GIRI, A.; SHARMA, G.D.; PRASAD, S.B. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. **Mutation Research**, v. 519, p. 75–82, 2002.

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

GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; MORAES, B.S.; SIMÕES, R.R.; SCHETINGER, M.R.C.; MORSCH, V.M.; LORO, V.L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**, v.146, p. 519-524, 2007.

GRUNE, T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. **Biogerontology**, v. 1, p. 31-40, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. In: **Free radicals in biology and medicine**. 3th ed. Oxford, University Press, Inc. N. Y., 1999.

HOPKINS, T.E.; WOOD, C.M.; WALSH, P.J. Interactions of cortisol and nitrogen metabolism in the ureogenic gulf toadfish *Opsanus beta*. **Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 2229–2235, 1995.

ISIK, I.; CELIK, I. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 92, p. 38-42, 2008.

JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N.; FERREIRA, C.J.; RIBEIRO, E.O. Risk assessment of the herbicide clomazone to aquatic life. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, v. 26, p. 1724–1726, 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.

KAMMAN, M.; BUNKE, H.; STEINHART, N.; THEOBALD, A. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with comet assay. **Mutation Research**, v. 498, p. 67–77, 2001.

KEHRER, J.P. Free radicals as mediator of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 23, p. 21-48, 1993.

KEHRER, J.P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KIME, D.E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 5 (1), p. 52-96, 1995.

LEDIRAGE, N.; ANThERIEU, S.; D'UBy, A.D.; CARON, J.C.; RAHAMANI, R. Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. **Toxicology Science**, v. 86, p. 444–452, 2005.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of single-cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and fresh water) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43–64, 2003.

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

LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F.; NOVO, L. A.; DE ALBUQUERQUE, C.; MOREIRA, J. C. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental Pollution**, v. 156(3), p. 974-979, 2008.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, J.; HUANG, D. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetachlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 21–26, 2006.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. Effects of different environmental oxygen levels on free radicals processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 144, p. 283-289, 2006.

MARAN, E.; FERNÁNDEZ, M.; BARBIERI, P.; FONT, G.; RUIZ, M.J. Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 922-930, 2009.

MARCHEZAN, E.; TELÓ, G.M.; GOLOMBIESKI, J.I.; LOPES, S.J. Produção integrada de arroz irrigado e peixes. **Ciência Rural**, v. 36, p. 411-417, 2006.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips, **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148–158, 2006.

MEISTER, A.; ANDERSEN, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711–760, 1983.

MELCHIORRI, D.; ORTIZ, G.G.; REITER, R.J.; SEWERYNEK, E.; DANIELS, W.M.; PABLOS, M.I.; NISTICO, G. Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. **Toxicology Letters**, v. 95, p. 103–108, 1998.

MENEZES, J.R.R.; YANCEY, D.R. **Manual de Criação de Peixes**. São Paulo. Inst. Camp. Ensino Agrícola, p. 117, 1984.

MENEZES, C.C.; VANIA, V.; FONSECA, M.B.; MORSCH, V.M.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B. Roundup® effects on oxidative stress parameters of *Rhamdia quelen* and recovery pattern. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 665-671, 2011.

MIRON, D.; CRESTANI, M.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M.A.; MORAES, G.; VIEIRA, V.L.P. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 398-403, 2005.

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

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, **Mutation Research**, v. 399, p. 135–147, 1998.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.

MONTEIRO, D.A.; ALMEIDA, J.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to

organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 143, p. 141-149, 2006.

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

MORAES, B.S.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; FONSECA, M.B.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; REIMCHE, G.B.; AVILA, L.A. Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 57-62, 2009.

MORAES, B.S.; CLASEN, B.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; TONI, C.; AVILA, L.A.; MARCHEZAN, E.; MACHADO, S.L.O.; ZANELLA, R.; REIMCHE, G.B. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, IN PRESS, DOI:10.1016/j.ecoenv.2009.05.013s, 2011.

MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da Moderna Aquicultura**. Canoas: Ed. ULBRA, p. 200, 2001.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. São Paulo: Artmed, p. 675, 919, 2011.

NIGG, H.N.; KNAAK, J.B. Blood Cholinesterases as Human Biomarkers of Organophosphorus Pesticide Exposure. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 163, p. 29-112, 2000.

NIGRO, M.; FALLENI, A.; BARGA, I.D.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environment: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 77, p. 339–347, 2006.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NUNES-TAVARES, A.; MATTA, N.; BATISTA, C.M. Inhibition of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (L.) by tricyclic antidepressants. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 34, p. 1071-1079, 2002.

NWANI, C.D.; LAKRA, W.S.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K. Mutagenic and genotoxic effects carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 202-208, 2010.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, p. 442, 2003.

OLIVERIA, A.; RAMIREZ, B.; GARCIA, F.P. Genotoxic damage in Zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. **Mutagenesis**, v. 20, p. 291–295, 2005.

ORUÇ, E.O.; 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.

ORUÇ, E.Ö.; ÜNER, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 127, p. 291-296, 2000.

ORUÇ, E.Ö.; USTA, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 48-55, 2007.

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

PANDEY, S.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; SHARMA, S.; SRIVASTAVA, S.K.; VERMA, M.S. Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa puctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 56–61, 2006.

PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 112-117, 2005.

PARVEZ, S.; PANDEY, S.; ALI, M.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress in Wallago attu (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. **Science of the Total Environment**, v. 368, p. 627–636, 2006.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G.I.; VELNA, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. 2000. Detection of micronuclei in the haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail by the pesticide pentachlorophenol. **Mutation Research**, v. 465, p. 145–150, 2000.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAÍNHA-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, p. 91-96, 2006.

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquatic Toxicology**, v. 65, p. 337–360, 2003.

POLEZ, V.L.P.; MORAES, G.; SANTOS-NETO, C. Different biochemical strategies of two Neotropical fish to cope with the impairment of nitrogen excretion during air exposure. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 36, p. 279–285, 2003.

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

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; PESSANO, E. F. C.; AZEVEDO, C. L.O. Ocorrência da Carpa Húngara, *Cyprinus carpio* (LINNAEUS, 1758) e disseminação parasitária, no Arroio Felizardo, Bacia do Médio Rio Uruguai, RS, Brasil. **Biodiversidade Pampeana**, PUCRS, Uruguai, v. 3, p. 21-23, 2005.

RAO, J.V. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. **Chemosphere**, v. 65, p. 1814-1820, 2006.

RESGALLA, Jr.C.; NOLDIN, J.A.; SANTOS, A.L.; SATO, G.; EBERHARDT, D.S. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura de arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 59-68, 2002.

RISSE-DE FAVERNEY, C.; DEVAUX, A.; LAFURIE, M.; GIRARD, J.P.; BAILLY, B.; RAHMANI, R. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicology*, v. 53, p. 65–76, 2001.

RISSE-DE FAVERNEY, C.; ORSINI, N.; DE SOUSA, G.; RAHMANI, R. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, v. 69, p. 247–258, 2004.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**, 5ª ed. Londrina: IAPAR, p. 461–466, 2005.

ROEX, E.W.M.; KEIJZERS, R.; 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.

SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. ***Archives of Environmental Contamination and Toxicology***, v. 35, p. 484-491, 1998.

SAHA, N.; RATHA, B.K. Induction of ornithine–urea cycle in a freshwater teleost, *Heteropneustes fossilis*, exposed to high concentrations of ammonium chloride. ***Comparative Biochemistry and Physiology, Part B***, v. 108, p. 315–325, 1994.

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

SANCHO, E.; VILLARROEL, M.J.; ANDREU, E.; FERRANDO, M.D. Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. ***Chemosphere***, v. 74, p. 1171-1178, 2009.

SANCHO, E.; VILLARROEL, M.J.; FERNÁNDEZ, C.; ANDREU, E.; FERRANDO, M.D. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 73, p. 370-376, 2010.

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

SCARPATO, R.; MIGLIORE, L.; ALFINITO, C.G.; BARALE, R. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. ***Marine Pollution Bulletin***, v. 21, p. 74–80, 1990.

SENSEMAN, S.A. **Herbicide Handbook**. 9th ed. Weed Science Society of America, Lawrence, Kan, USA, p. 458, 2007.

SHARBEL, W.M. Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v. 347, p. 15–24, 2004.

SHARMA, S.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; PANDEY, S.; SRIVASTAVA, S.K.; SINGH, P.J.; MATHUR, P.K. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 617–623, 2007.

SHI, H.H.; WANG, X.R.; LUO, Y.; SU, Y. Electron paramagnetic resonance evidence of hydroxyl radical generation and oxidative damage induced by tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 365–371, 2005.

SHWETA, A.; PANDEY, K.C.; GOPAL, K. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 268-272, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, J.M. da; SANTOS, J.R. dos. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 565-573, 2007.

SILVA, L.B.; BARCELLOS, L.J.G.; QUEVEDO, R.M.; SOUZA, S.M.G.; KREUTZ, L.C.; RITTER, F.; FINCO, J.A.; BEDIN, A.C. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South America: Initial growing period. **Aquaculture**, v. 255, p. 417-428, 2006.

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

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206– 221, 2000.

TONI, C.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; CLASEN, B.E.; CATTANEO, R.; SANTI, A.; PRETTO, A.; ZANELLA, R.; LEITEMPERGER, J. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 590-595, 2010.

TONI, C, LORO, V.L., SANTI, A., MENEZES, C.C., CATTANEO, R., CLASEN, B.E., ZANELLA, R. Exposure to tebuconazol in rice Field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 153(1), p. 128-132, 2011.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. 2008. 70f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

ÜNER, N., ORUÇ, E.O., SEVGILER, Y., SAHIN, N., DURMAZ, H., USTA, D. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.21, p.241-245, 2006.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

VANDEPUTTE, M. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. **Aquatic Living Resources**, v. 16, p. 399-407, 2003.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VENCIL, W.K.; ARMBRUST, K.; HANCOCK, H.G. **Herbicide Handbook**, 8th ed. Weed Science Society of America, Lawrence, Kan, USA, p.103–107, 2002.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 90, p. 42–51, 2008.

VENTURA, A.L.M.; ABREUI, P.A.; FREITAS, R.C.C.; SATHLER, P.C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H.C. Colinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37 (2), 2010.

WALSH, P.J.; DANULAT, E.; MOMMSEN, T.P. Variation in urea excretion in the gulf toadfish *Opsanus beta*. **Marine Biology**, v. 106, p. 323–328, 1990.

WESSEL, N.; ROUSSEAU, S.; CAISEV, X.; QUINIQU, F.; AKCHA, F. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo(a) pyrene 17alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, v. 85, p. 133–142, 2007.

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

XIAO, H.Y.; SHAO, N.L.; ZHANG, L.; GUO, N.Z.; HUI, S.Z. Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 280-286, 2008.

YAMANO, T.; MORITA, S. Effects of pesticides on isolated hepatocytes, mitochondria and microsomes 11. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 28, p. 1–7, 1995.

YI, M.Q.; LIU, H.X.; SHI, X.Y.; LIANG, P.; GAO, X.W. Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 143, p. 113-116, 2006.

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

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X; WU, J.; XUE, Y. 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, 2004.

DEMAIS TRABALHOS DESENVOLVIDOS DURANTE O CURSO DE DOUTORADO

1. CATTANEO, R., CLASEN, B., LORO, V.L., MENEZES, C.C., MORAES, B.S., SANTI, A., TONI, C., AVILA, L.A., ZANELLA, Z. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to the herbicide penoxsulam at rice field condition. **Journal of Applied Toxicology**, IN PRESS, DOI 10.1002/jat.1606, 2011.
2. CATTANEO, R., CLASEN, B., LORO, V. L., MENEZES, C., PRETTO, A., BALDISSEROTTO, B., SANTI, A., AVILA, L.A. Metabolic parameters of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to commercial formulation of glyphosate (Roundup®). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, IN PRESS, 2011.
3. MENEZES, C., VIEIRA, V.L.P., FONSECA, M. B., CATTANEO, R., PRETTO, A., MIRON, D. S., SANTI, A. Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* in response to commercial herbicide containing clomazone and recovery pattern. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, IN PRESS, 2011.
4. TONI, C, LORO, V.L., SANTI, A., MENEZES, C.C., CATTANEO, R., CLASEN, B.E., ZANELLA, R. Exposure to tebuconazol in rice Field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 153(1), p. 128-132, 2011.
5. PRETTO, A., LORO, V.L., BALDISSEROTTO, B., PAVANATO, M.A., MORAES, B.S., CATTANEO, R., CLASEN, B., FINAMOR, I.A., DRESSLER, V. Effects of water cadmium concentrations on bioaccumulation and various oxidative stress parameters in *Rhamdia quelen*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60 p.309-318, 2011.
6. MENEZES, C.C., VANIA, V., FONSECA, M.B., MORSCH, V.M., SANTI, A., CATTANEO, R., CLASEN, B. Roundup® effects on oxidative stress parameters of *Rhamdia quelen* and recovery pattern. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, IN PRESS, DOI 10.1007/s00244-010-9574-6, 2011.
7. TONI, C., MENEZES, C., LORO, V.L., CLASEN, B., CATTANEO, R., SANTI, A., ZANELLA, R., LEITEMPERGER, J. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 590-595, 2010.
8. CLASEN ,B., LORO, V.L., CATTANEO, R., MORAES, B., MENEZES, C.C., AVILA, L.,A, ZANELLA, R., REIMCHE, G.B., BALDISSEROTTO, B. The effects of fipronil insecticide on non-target organism *Cyprinus carpio*: implication for rice-fish cultivation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, IN PRESS. 2011.

9. CLASEN ,B., LORO, V.L., CATTANEO, R., MORAES, B., MENEZES, C.C., PRETTO, A., ZANELLA, R. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to carbofuran in a rice field condition. **Journal of Applied Toxicology**, SUBMETIDO, 2011.

10. CATTANEO, R., FONSECA, M. B., PRETTO, A., CLASEN, B., MENEZES, C. C., TONI, C., LORO, V. L. Clomazone herbicide affects oxidative stress parameters in tissues of *Leporinus obtusidens*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, SUBMETIDO, 2011.

11. CATTANEO, R., FONSECA, M., LORO, V.L., PRETTO, A., CLASEN, B., MENEZES, C.C., MORAES, B.S., BALDISSEROTTO, B. Effects on Metabolic and Toxicological Parameters of Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed To Commercial Formualtion 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, SUBMETIDO, 2011.