



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

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CARPAS (*Cyprinus carpio*) EXPOSTAS AOS
INSETICIDAS CARBOFURAN E FIPRONIL EM
CONDIÇÕES DE LAVOURA DE ARROZ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bárbara Estevão Clasen

Santa Maria - RS, Brasil

2009

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CARPAS
(*Cyprinus carpio*) EXPOSTAS AOS INSETICIDAS CARBOFURAN E
FIPRONIL EM CONDIÇÕES DE LAVOURA DE ARROZ**

por

Bárbara Estevão Clasen

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

Orientador: Prof. Dr. Vania Lucia Loro

Santa Maria – RS, Brasil

2009

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

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

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CARPAS
(*Cyprinus carpio*) EXPOSTAS AOS INSETICIDAS CARBOFURAN E
FIPRONIL EM CONDIÇÕES DE LAVOURA DE ARROZ**

elaborada por

Bárbara Estevão Clasen

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Vania Lucia Loro

(Orientador – Presidente)

Prof. Dr^a. Nilda Berenice Vargas Barbosa (UFSM)

Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto (UFSM)

Santa Maria, 24 de julho de 2009.

Dedico este trabalho aos meus pais Marco e Zoraia, pois sei que através desta conquista eles também estão se realizando. Aos meus irmãos Pablo e Bibiana, pela presença amiga e pelas palavras de apoio, em todos os momentos. Obrigada por seus ensinamentos, por suas palavras de incentivo e por seu exemplo de amor em toda minha vida, enfim todo o incentivo de sempre, com certeza este trabalho é o resultado do amor, do carinho, da dedicação e da experiência de vida que me foi passado.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e por todas as oportunidades que apareceram para mim guiadas por Ele;

Aos meus pais, meu porto seguro, meus maiores exemplos de ética, honestidade, companheirismo, fidelidade, pelo carinho, apoio, compreensão, amor incondicional, por me ensinarem os valores de uma pessoa digna e responsável. Obrigada pelo amor, pela compreensão e confiança em mim sempre depositadas, Jamais esquecerei de tudo que sempre fizeram, sem medir esforços, para que eu estivesse hoje onde estou!

Ao meu irmão Pablo e minha irmã Bibiana, pelos momentos de descontração com seus sorrisos maravilhosos e por sempre torcerem por mim;

A minha orientadora, professora Vania Lucia Loro, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, tempo dedicado, por todos os ensinamentos, por toda a confiança e amizade durante estes anos de convivência; Enfim, obrigada por tudo;

Ao meu co-orientador, professor Luis Antonio de Avila, por sua imensa disponibilidade em me ajudar, ensinar e guiar. Muito obrigada por sua amizade e compreensão sempre;

A minha melhor amiga irmã Roberta, obrigada por compartilhar todos os momentos durante esses anos, por estar ao meu lado SEMPRE. Por muitas vezes ter sido minha família aqui em Santa Maria. Pelo seu apoio, amizade, companheirismo...és uma amiga em que confio de olhos fechados...obrigada por tudo!

As amigas Alexandra e Bibiana, obrigada por sua disponibilidade em me ajudar sempre. Por sua paciência, sua competência, seu carinho, sua amizade, seu sorriso e seus ensinamentos;

A Charlene, minha colega e amiga, por sua tranquilidade, companheirismo, por sempre acreditar que não estamos aqui por acaso, mas sim por que merecemos, obrigada Char.

A colega e amiga Adriana, sempre presente com seu jeito único e adorável, por seus conselhos sinceros, sua dedicação e disponibilidade;

A amiga e colega Cândida, por sua dedicação, pela sua tranquilidade, seu apoio, sua disponibilidade, meu sincero muito obrigada;

A Aracéli, pelos seus conselhos e opiniões sinceras, seu carinho, sua alegria, enfim sua amizade;

A colega e amiga Milene, obrigada por ter guiado meus primeiros passos dentro do nosso laboratório, por sempre transmitir otimismo e alegria;

A Daiane, que mesmo estando a pouco tempo em nosso laboratório já és mais que colega e já faz parte da família 2238, obrigada pelas palavras de apoio e por sempre me transmitir segurança;

A minha amiga do coração Faída, sempre me apoiando e insentivando desde os tempos da graduação, obrigada por sempre estar ao meu lado.

Aos Professores Sérgio Luiz de Oliveira Machado, Enio Marchesan e Renato Zanella, por todo o suporte técnico na realização do projeto, colaborando de maneira indispensável com este trabalho;

Ao colega Geovane, pela ajuda na execução deste trabalho;

Aos professores do curso pelos ensinamentos;

Aos professores Nilda Barbosa e Bernardo Baldisserotto por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação;

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica que há tantos anos forma e aperfeiçoa profissionais;

Ao CNPq, pela bolsa concedida;

Meus agradecimentos aos amigos e pessoas que de uma forma ou de outra auxiliaram para a realização deste trabalho e que com pesar não mencionei nesses agradecimentos seletivos;

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CARPAS (*Cyprinus carpio*) EXPOSTAS AOS INSETICIDAS CARBOFURAN E FIPRONIL EM CONDIÇÕES DE LAVOURA DE ARROZ

AUTORA: BÁRBARA ESTEVÃO CLASEN

ORIENTADOR: VANIA LUCIA LORO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de julho de 2009.

A contaminação do ambiente aquático por agrotóxicos é um problema de importância mundial, devido ao seu efeito tóxico em organismos não-alvo. Estes produtos podem afetar parâmetros toxicológicos em peixes. As carpas são peixes cultivados na região Sul do Brasil e possuem grande interesse comercial. Existem poucos estudos em nosso país relacionando o uso de agrotóxicos e sua toxicidade nestes peixes. O objetivo deste estudo foi verificar se inseticidas utilizados na lavoura de arroz alteram parâmetros toxicológicos em juvenis de carpas (*Cyprinus carpio*). Através dos resultados obtidos foram determinados biomarcadores de toxicidade para estes inseticidas. As carpas foram expostas a dois tipos de inseticidas por sete, 30 ou 90 dias em condição de lavoura de arroz. Após os períodos experimentais foram avaliados parâmetros toxicológicos e de estresse oxidativo nos tecidos hepático, cerebral e muscular. Os parâmetros enzimáticos analisados foram: atividade da catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST). Além disso, analisaram-se parâmetros de estresse oxidativo, como a carbonilação de proteínas no tecido hepático e níveis de TBARS em fígado, cérebro e músculo. Os resultados mostraram que após exposição à formulação comercial do inseticida carbofuran a catalase apresentou sua atividade aumentada no tecido hepático após 30 dias de exposição. A atividade da enzima não foi alterada aos sete ou 90 dias em fígado de carpas expostas ao inseticida carbofuran. A enzima GST diminuiu após sete e 90 dias de exposição. Por outro lado, em 30 dias sua atividade aumentou no fígado de peixes expostos ao inseticida. Os níveis de proteína carbonil diminuíram em fígado de carpas expostas por sete, 30 ou 90 dias ao carbofuran. Os níveis de TBARS foram aumentados em praticamente todos os períodos e tecidos considerados, com exceção do tecido hepático e muscular, que aos sete dias de exposição mostrou os níveis de TBARS inalterados. A exposição à formulação comercial do inseticida fipronil diminuiu atividade da catalase em todos os períodos e tecidos testados. Os níveis de proteína carbonil foram aumentados após 30 dias de exposição ao fipronil, enquanto que aos sete ou 90 dias não houve alteração nos níveis de proteína carbonil. Os níveis de TBARS aumentaram em todos os períodos e tecidos em carpas expostas ao fipronil. Estes resultados indicam que os parâmetros medidos podem ser bons indicadores da contaminação destes

pesticidas em tecidos de carpa após exposição prolongada. De acordo com os resultados obtidos, podemos considerar a determinação de proteína carbonil no tecido hepático e TBARS em cérebro, músculo e fígado como biomarcadores de toxicidade em carpas para o carbofuran. Para o fipronil os resultados encontrados na atividade da enzima catalase em fígado e nos níveis de TBARS em todos os tecidos estudados, permitem-nos considerá-los biomarcadores de toxicidade.

Palavras-chave: carpa (*Cyprinus carpio*), inseticidas, estresse oxidativo, parâmetros toxicológicos

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN CARP (*Cyprinus carpio*) EXPOSED TO CARBOFURAN AND FIPRONIL INSECTICIDES IN RICE FIELD CONDITIONS

AUTHOR: BÁRBARA ESTEVÃO CLASEN

ADVISOR: VANIA LUCIA LORO

Data and Place of the defense: July, 24th, 2008, Santa Maria

The contamination of the aquatic environment by pesticides is a problem of global importance because of their toxic effect on non-target organisms. These products may affect toxicological parameters and oxidative stress in fish. The carp is cultivated in southern of Brazil and has great commercial interest. There are few studies in our country regarding the use of pesticides and their toxicity in these fish. The aim of this study was to determine if the insecticides used in rice farming alter these parameters in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). Through obtained results toxicity biomarkers to insecticides were determined. The carps were exposed to insecticides for seven, 30 or 90 days in rice field condition. After the experimental periods, toxicological parameters and oxidative stress were evaluated in liver, brain and muscle. The parameters analyzed were the enzymatic activity of catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST). Furthermore, parameters of oxidative stress, such as protein carbonyl in the liver and levels of TBARS in the liver, brain and muscle were examined. The results showed that after exposure to the commercial formulation of the insecticide carbofuran the CAT increased its activity in hepatic tissue after 30 days of exposure. The enzyme activity was not changed in the liver of carp exposed to carbofuran for seven or 90 days. The GST decreased after seven and 90 days of exposure. On the other hand, after 30 days its activity increased in the liver of fish exposed to this insecticide. The protein carbonyl levels reduced in the liver of carp exposed for seven, 30 or 90 days to carbofuran. The TBARS levels increased in almost all tissues and periods considered, except the liver and brain that showed TBARS levels unchanged at seven days of exposure. Exposure to commercial formulation of insecticide fipronil showed that the activity of CAT reduced in all periods and tissues tested. The protein carbonyl levels increased after 30 days of exposure fipronil, while at seven and 90 days there was no change in the levels of protein carbonyl. The TBARS levels increased in all periods and tissues in carp exposed to fipronil. These results indicate that the measured parameters can be indicators of contamination to insecticides in *Cyprinus carpio* after prolonged exposure. According to the results obtained we consider the determination of protein carbonyl in hepatic tissue and TBARS in liver, brain and muscle tissue as biomarkers of carbofuran toxicity in carp after 90 days of exposure. For fipronil the results found in the activity of the CAT in liver and TBARS levels in all tissues studied, allow us to consider them biomarkers of insecticide toxicity.

Keywords: carp (*Cyprinus carpio*), insecticides, oxidative stress, toxicological parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Estrutura química do carbofuran.....	21
FIGURA 2 – Destinos ambientais do carbofuran	23
FIGURA 3 – Estrutura química do fipronil.....	23
FIGURA 4 – Destinos ambientais do fipronil.....	25
FIGURA 5 – Exemplar de carpa húngara (<i>Cyprinus carpio</i>) juvenil.....	26
FIGURA 6 – Dano oxidativo a macromoléculas biológicas.....	28
FIGURA 7 – Mecanismo antioxidante enzimático.....	29

MANUSCRITO 1

FIGURE 1 – Catalase activity in liver of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to carbofuran (7, 30 or 90 days)	48
FIGURE 2 – Glutathione S-transferase activity in liver of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to carbofuran (7, 30 or 90 days).....	49
FIGURE 3 – Protein carbonyl in liver of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to carbofuran (7, 30 or 90 days).....	50

MANUSCRITO 2

FIGURE 1 – Protein carbonyl in liver of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to fipronil (7, 30 or 90 days).....	67
FIGURE 2 – Catalase activity in liver of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to fipronil (7, 30 or 90 days).....	67
FIGURE 3 – Glutathione S-transferase activity in liver of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to fipronil (7, 30 or 90 days).....	68

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

TABLE 1 – Concentration ($\mu\text{g/L}$) of carbofuran in rice field water (0, 7, 14, 21, 28, 45 or 90 days).....	45
TABLE 2 – TBARS levels in brain, liver and muscle of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to carbofuran (7, 30 or 90days).....	46

MANUSCRITO 2

TABLE 1 – TBARS levels in brain, liver and muscle of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to fipronil (7, 30 or 90 days).....	69
TABLE 2 – Concentration ($\mu\text{g/L}$) of fipronil in rice field water (0, 7, 14, 21, 28, 45 or 90 days).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT: catalase

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

EROs: espécies reativas de oxigênio

GPx: glutathione peroxidase

GST: glutathione S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

LPO: peroxidação lipídica

MDA: malondialdeído

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SDS: lauril sulfato de sódio ou duodecil sulfato de sódio

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

SOD: superóxido dismutase

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
APRESENTAÇÃO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Contaminacao ambiental.....	20
3.2 Inseticidas.....	21
3.2.1 Carbofuran.....	21
3.2.2 Fipronil.....	23
3.3 Carpa húngara (<i>Cyprinus carpio</i>).....	25
3.4 Estresse oxidativo.....	26
4 MANUSCRITOS	
4.1 Manuscrito 1: Oxidative stress biomarkers in <i>Cyprinus carpio</i> exposed to carbofuran in a rice field condition. Bárbara Estevão Clasen, Vania Lucia Loro, Roberta Cattaneo, Bibiana Silveira Moraes, Charlene Cavalheiro de Menezes, Adriana Santi, Alexandra Pretto ^a and Renato Zanella.....	30
4.2 Manuscrito 2: <i>Cyprinus carpio</i> responses after exposure to insecticide fipronil at rice field condition. Bárbara Clasen, Vania Lucia Loro, Roberta Cattaneo, Charlene C. de Menezes, Luis Antonio de Avila, Adriana Santi, Renato Zanella, Geovane Boschmann Reimche.....	51
5 DISCUSSÃO.....	70
6 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

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 **MANUSCRITOS.** As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam a integra deste trabalho.

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

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

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos de agrotóxicos oriundos de campos agrícolas podem facilmente contaminar corpos de água, resultando em sérios danos a muitas espécies, incluindo peixes (SENGER et al., 2005). São denominados de agrotóxicos todas as substâncias ou misturas que tem como objetivos impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga. É um termo utilizado que agrupa herbicidas (controlam plantas daninhas), inseticidas (usado no controle de insetos), fungicidas (controlam fungos causadores de doenças), nematicidas (controlam nematóides) e acaricidas (usados no controle de ácaros) (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

Os agrotóxicos são substâncias amplamente usadas na agricultura, pois os mesmos possibilitam o aumento da produtividade agrícola e têm auxiliado no controle de vetores de diversas doenças. Entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente. Dentre os efeitos nocivos a este, pode-se citar a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais. Devido aos seus efeitos tóxicos em organismos não-alvo, muitos agrotóxicos podem prejudicar os ecossistemas aquáticos (ORUÇ & ÜNER, 1999; BRETAUD et al., 2000).

Dentre os agrotóxicos utilizados na lavoura de arroz, serão testados neste estudo dois inseticidas (fipronil e carbofurano).

O fipronil (Standak[®]) é um inseticida de amplo espectro e pertence à classe dos fenilpirazóis. Desde sua introdução no mercado, em 1996, o fipronil tem sido usado em lavouras de arroz, milho e algodão. É tóxico para muitos organismos não-alvo em concentrações ambientalmente elevadas. O fipronil é altamente tóxico para peixes, invertebrados aquáticos, aves, mas relativamente pouco tóxico para mamíferos (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996; ALVES et al., 2002; PEI et al., 2004; MIZE, et al., 2008).

O carbofuran (Furadan[®]), que pertence à classe dos carbamatos, é inseticida, nematicida e acaricida sistêmico de amplo espectro. Devido à sua ampla utilização na agricultura e relativa boa solubilidade em água, o carbofuran pode contaminar águas superficiais e subterrâneas. Os estudos disponíveis mostram que o carbofurano tem sido freqüentemente detectado como contaminante das águas subterrâneas na

América, bem como na Europa e na Ásia ao longo das últimas duas décadas (CAMPBELL et al., 2004; MAHALAKSHMI et al., 2007; BRKIĆ et al., 2008).

Apesar da preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos por inseticidas ter crescido no meio científico, no Brasil ainda são poucos os estudos relacionando a toxicidade destes em peixes, principalmente associados às culturas agrícolas. Neste sentido, estudos avaliando a toxicidade de inseticidas são importantes para verificar os efeitos destes compostos em peixes de interesse comercial como as carpas. A carpa húngara (*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).

Entre os efeitos que os agrotóxicos podem causar em peixes está a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alterações em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, o que pode evidenciar uma situação de estresse oxidativo (LIVINGSTONE, 2001). A formação de EROs pode estar associada a diferentes processos patológicos em peixes expostos a poluentes, tais como os inseticidas (SCANDALIOS, 2005). Em uma situação de estresse oxidativo pode ocorrer a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas (ALMROTH et al., 2005; PARVEZ & RAISUDDIN, 2005). Os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são essenciais para manter o funcionamento das células como uma importante defesa biológica contra o estresse oxidativo. As enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase são responsáveis pela proteção das células contra as EROs. Estudos mostram que quando a atividade destas enzimas se encontra alterada em peixes, pode ser um indicativo da exposição a poluentes aquáticos. Além disso, alguns antioxidantes podem ser usados como biomarcadores de exposição a poluentes aquáticos em peixes (BAINY, 1996; AHMAD et al., 2000 LI et al., 2003).

Várias respostas bioquímicas e fisiológicas ocorrem quando um pesticida entra no organismo, resultando na adaptação do organismo ao contaminante ou se o organismo não consegue metabolizar com eficiência estes produtos, os mesmos podem induzir toxicidade.

Sendo assim, pretende-se verificar parâmetros de estresse oxidativo e perfil antioxidante após exposição a dois inseticidas, carbofuran e fipronil, em sistema de

arroz irrigado. A partir dos resultados obtidos selecionar biomarcadores de intoxicação para esta espécie e inseticidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho será avaliar o efeito de formulações comerciais dos inseticidas carbofuran e fipronil sobre parâmetros de estresse oxidativo em juvenis de carpa húngara em sistema de arroz irrigado.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade da enzima antioxidante catalase em fígado de carpas expostas aos inseticidas carbofuran e fipronil.
- Verificar se a atividade da enzima glutationa-S-transferase se altera, em fígado, após exposição prolongada aos inseticidas.
- Investigar o possível estresse oxidativo, evidenciado por peroxidação lipídica, através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido hepático, cerebral e muscular e a carbonilação de proteínas em fígado.
- Selecionar entre os parâmetros analisados aqueles que podem ser biomarcadores de toxicidade para carbofuran e fipronil

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminação ambiental

As práticas agrícolas estão diretamente relacionadas com o uso de pesticidas, a fim de controlar as pragas que atacam os produtos cultivados. Entretanto, devido ao crescimento da população, das indústrias, da ciência e da tecnologia, houve uma necessidade de uma demanda maior de produtos agrícolas, tais como inseticidas, para acompanhar e controlar principalmente o aumento da produção vegetal. Em decorrência disso ocorreram danos aos diferentes ecossistemas devido ao desconhecimento da persistência e ação destes agentes no ambiente, ou mesmo, pela falta de planejamento de utilização dos mesmos. O uso indiscriminado de pesticidas na agricultura é uma grande causa de envenenamento no mundo, cerca de três milhões de casos de envenenamento severo são registrados e destes, duzentos e vinte mil culminam com morte. Cerca de 99% dos casos registrados ocorrem em países de terceiro mundo, onde os cuidados com aplicação e dosagem costumam ser menores (BANERJEE *et al.*, 1999, PRIMEL *et al.*, 2005).

Segundo Wilson e Tisdell (2001) o consumo mundial de pesticidas tem chegado a 2,6 milhões de toneladas e deste total, 85% são utilizados na agricultura. Considerando a América Latina, o Brasil desponta como o maior consumidor de agrotóxicos, com um consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região. De modo geral o consumo destes pesticidas no meio rural decresce na seguinte ordem: herbicidas > inseticidas > fungicidas. Embora os herbicidas sejam mais utilizados, em geral a toxicidade deste grupo de substâncias é inferior à dos inseticidas. Estes englobam compostos quimicamente bastante diferenciados, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: os organofosforados, os piretróides, os organoclorados e os carbamatos (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001).

A contaminação dos ambientes aquáticos por estes pesticidas oriundos das práticas agrícolas se tornou 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, BRETAUD *et al.*, 2000, OROPESA *et al.*, 2009). 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 (PAN & DUTTA, 1998). Além da possibilidade de contaminação dos cursos de água naturais, temos os sistemas de criação de peixes, prática muito empregada na região Sul da América do Sul. Grande parte dos criadouros localiza-se próximo ou dentro de áreas de plantações agrícolas, mantendo assim, um contato direto dos animais com os produtos químicos utilizados nas lavouras (SOSO *et al.*, 2007). Esses tóxicos causam alterações na composição química dos ambientes aquáticos, o que pode causar sérios prejuízos à fauna natural (ORUÇ *et al.*, 2004; ADHIKARI *et al.*, 2004). Assim, a presença contínua de componentes tóxicos nas águas pode causar alterações diversas em peixes, inclusive no comportamento reprodutivo, podendo chegar até mesmo à mortalidade destes indivíduos. Um efeito a longo prazo pode culminar na extinção de espécies mais susceptíveis a esse tipo de variação ambiental (SOSO *et al.*, 2007).

3.2 Inseticidas

3.2.1 Carbofuran

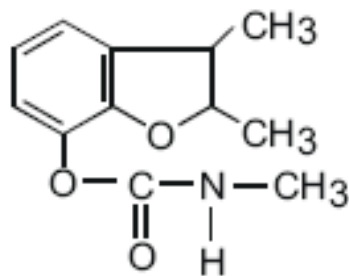


Figura 1: Estrutura química do inseticida carbofuran (adaptado de Nunes *et al.*, 2002).

Nome comum: carbofuran

Grupo Químico: carbamato

Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-metilcarbamato

Classe: inseticida, nematicida

Fórmula molecular: C₁₂H₁₅NO₃

Massa Molar: 221,3 g/mol

Classe toxicológica: I

Solubilidade em água: 320 mg/L (20°C)

Intervalo de segurança: 30 dias

O Carbofuran (Furadan[®]), (Figura 1) que pertence à classe dos carbamatos, é um inseticida, nematicida e acaricida sistêmico de amplo espectro comumente usado mundialmente. Seu mecanismo de ação está ligado à transmissão sináptica, onde ele age inibindo a enzima acetilcolinesterase. Este composto é muito tóxico para peixes e mamíferos (MAHALAKSHMI *et al.*, 2007; BRKIĆ *et al.*, 2008). Devido à sua ampla utilização na agricultura e relativa boa solubilidade em água, o carbofuran pode contaminar águas superficiais e subterrâneas e, por isso, causar toxicidade em consumidores, bem como ao meio ambiente. Os dados disponíveis mostram que o carbofuran tem sido freqüentemente detectado como contaminante das águas subterrâneas na América, bem como na Europa e na Ásia ao longo das últimas duas décadas (GARCIA DE LLASERA e BERNAL-GONZALES, 2001; CAMPBELL *et al.*, 2004). Muitos fatores influenciam a degradação dos carbamatos. Entre eles a umidade, a temperatura, a luz e a volatilidade. Carbamatos são metabolizados por microrganismos, plantas e animais ou degradados na água e no solo, especialmente em meio alcalino (Figura 2). Sua decomposição envolve a formação de amônia, amina, dióxido de carbono, fenol e alcoóis (NUNES *et al.* 2002).

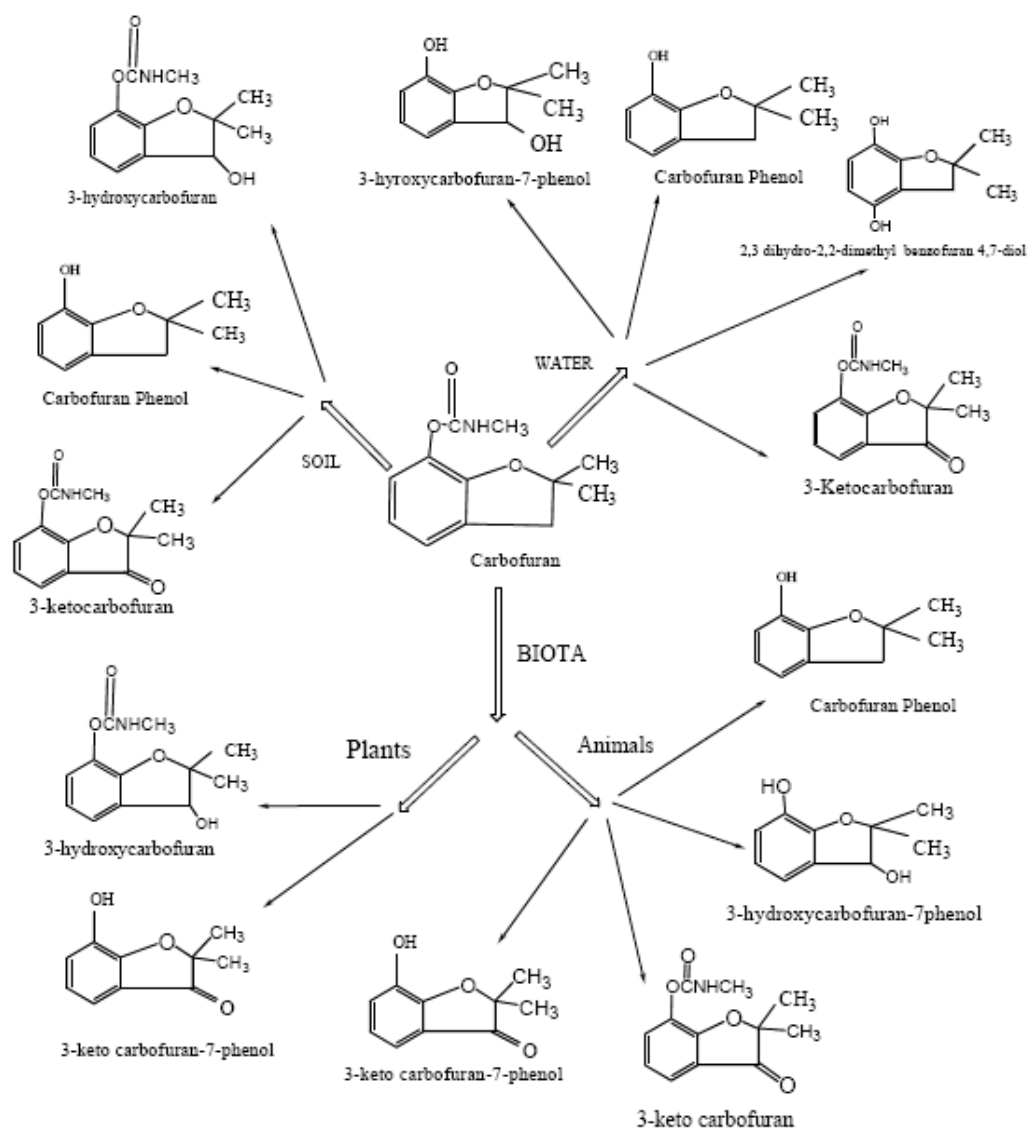


Figura 2: Destino ambiental do carbofuran (adaptado de Singh, 1999).

3.2.2 Fipronil

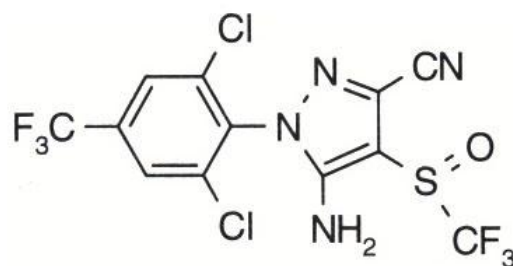


Figura 3: Estrutura química do inseticida fipronil (adaptado de Bobé *et al.*, 1998).

Nome comum: fipronil

Grupo Químico: fenil-pirazol

Nome químico (IUPAC): 5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile

Classe: inseticida, formicida, cupinicida

Fórmula molecular: $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$

Massa Molar: 473,2

Classe toxicológica: II

Solubilidade em água: 0,024 g/L (pH=5)

Intervalo de segurança: não determinado devido à modalidade de emprego

Fipronil é um inseticida do grupo dos fenil-pirazois (Figura 3), exibe atividade neurotóxica, sendo altamente efetivo contra diversos gêneros de insetos. Estudos realizados em diversos países demonstraram que fipronil propicia um controle prolongado de insetos, o que praticamente acaba com o repasse de tratamento (US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996; STARK & VARGAS, 2005).

O ingrediente ativo do fipronil tem um modo de ação único e exclusivo, devido à especificidade e precisão do local atingido no Sistema Nervoso Central (SNC). A transmissão do impulso nervoso nas células do SNC acontece em função da diferença de concentração de íons dentro e fora dessas células. O estabelecimento do equilíbrio iônico nas células SNC é garantido graças ao GABA (Ácido Gama Amino Butírico), uma substância que controla o fluxo de íons cloreto através da membrana da célula nervosa. Pesquisas recentes mostram que o ingrediente ativo do fipronil pode reverter a ação do GABA, alterando o equilíbrio iônico nas células do SNC, com conseqüente morte dos insetos. O GABA é o principal neurotransmissor inibidor nos insetos, daí sua importância na regulação da atividade do SNC (WIRTH *et al.*, 2004; TAN *et al.*, 2008). A toxicidade do fipronil a insetos é bem documentada na literatura. No entanto, seu efeito tóxico em peixes em concentrações subletais é pouco conhecido. (FAOUDER *et al.*, 2007). Em meio aquático, fipronil sofre degradação e transforma-se em outro produto, também tóxico, denominado disulfenil. Quando exposto à luz solar o disulfenil apresenta ação neurotóxica, semelhante à molécula original do fipronil. A fotólise é o caminho mais importante para a degradação do fipronil aquoso, entretanto a hidrólise só se tornará importante se o meio apresentar pH básico. O fipronil é estável à hidrólise em água

com pH ligeiramente ácido (pH 5,0 – 6,0) a neutro (pH 7,0) sem a presença de luz (Figura 4) (BOBÉ *et al.*, 1998).

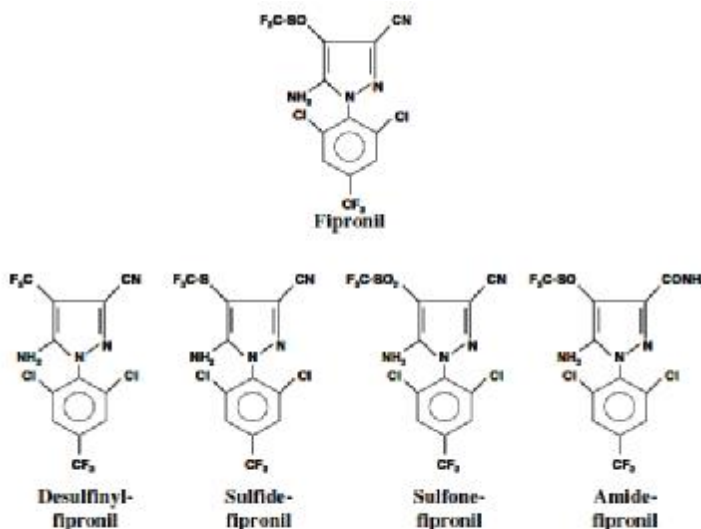


Fig. 1. Chemical structures of fipronil and metabolites.

Figura 4: Destino ambiental do fipronil (adaptado de Bobé *et al.*, 1998).

3.3 Carpa húngara (*Cyprinus carpio* L.1758)

A carpa, peixe da família Cyprinidae, gênero *Cyprinus*, espécie *Cyprinus carpio* L. 1758 (Figura 5) é uma espécie exótica, de origem asiática, criada na China. Há mais de 2.000 anos (CASTAGNOLLI & CYRINO, 1986). 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 Brasil, muitas pisciculturas utilizam a carpa húngara, *Cyprinus carpio*, sendo esta uma das primeiras espécies a serem cultivadas. 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).

Segundo Moreira *et al* (2001), as carpas, pela sua capacidade de resistir a uma ampla faixa de temperatura, são hoje animais cosmopolitas, sendo que seu crescimento ótimo dá-se com temperatura média de 28°C. Seu crescimento pode ser afetado por temperaturas abaixo de 15°C. Estas, não se reproduzem quando a

temperatura cai abaixo de 20°C e não ingerem 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, pára de se alimentar com nível de 2,5 mg/L e pode morrer com 0,8 mg/L (MENEZES & YANCEY, 1984; GALLI & TORLONI, 1989). 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 possui um pequeno número de escamas, sendo estas maiores que as da carpa comum, dispostas em três fileiras, na região dorsal, sobre a linha lateral e na região ventral. Apresenta crescimento precoce, uma alta relação entre altura e comprimento do corpo podendo atingir mais de 20 kg (MOREIRA *et al*, 2001).



Figura 5: Exemplar de carpa húngara (*Cyprinus carpio*) juvenil.

3.4 Estresse oxidativo

As reações de oxidação são essenciais no metabolismo normal dos organismos aeróbicos, principalmente porque o elemento oxigênio atua como acceptor de elétron no sistema de fluxo de elétrons, sendo responsável pela geração de energia via fosforilação oxidativa (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006). As EROs (espécies reativas de oxigênio) são produzidas durante a função celular normal de células aeróbicas e, além disso, elas podem ser geradas como

consequência do metabolismo intracelular de compostos exógenos, levando à peroxidação lipídica, oxidação de algumas enzimas e a oxidação e degradação de proteínas (MATÉS, 2000). As EROs incluem o radical anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), e estas espécies possuem alta reatividade química (BARATA *et al.*, 2005).

Atualmente, os organismos aquáticos estão continuamente sendo expostos a diversos contaminantes químicos e por isso efeitos adversos podem surgir como resposta aos diferentes mecanismos de toxicidade destes produtos (BARATA *et al.*, 2005). Uma variedade de poluentes ambientais, dentre eles os pesticidas, podem provocar um aumento na produção de radicais livres em diversos organismos aquáticos, como os peixes, e se os sistemas de defesas antioxidantes forem ineficiente para combater as EROs ocorre uma situação de estresse oxidativo (AHMAD *et al.*, 2000; ÜNER *et al.*, 2005). O estresse oxidativo é um fenômeno bastante complexo que culmina com a formação elevada de EROs. Pode também ser definido como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, onde a quantidade gerada do primeiro é maior, ocorrendo assim possíveis danos oxidativos (ÜNER *et al.*, 2006; ALMROTH *et al.*, 2008). Diversos autores já evidenciaram estresse oxidativo em peixes expostos a diferentes agrotóxicos (SAYEED *et al.*, 2003; BAGNYUKOVA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; PEIXOTO *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007).

As EROs podem modificar todas as macromoléculas celulares, incluindo as proteínas, os lipídios e o DNA (SIES, 1993) (Figura 6). O seu ataque às proteínas pode ocasionar clivagem das ligações peptídicas, modificações nos resíduos dos aminoácidos, reações de peptídios com lipídios e com produtos da oxidação dos carboidratos, oxidação dos grupos sulfidril, formação de proteína carbonil, etc (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006). Recentemente alguns autores têm sugerido 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 peroxidação lipídica (LPO) causa danos importantes no sistema biológico e tem sido muito utilizada também como biomarcador de estresse oxidativo em peixes (SAYEED *et al.*, 2003). A lipoperoxidação é o resultado da atuação dos radicais livres sobre as membranas biológicas que são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (ORUÇ & USTA, 2007). Dentre os lipídios, os ácidos graxos

poliinsaturados são os mais sensíveis ao ataque das EROs (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006). O processo de LPO influencia a fluidez da membrana e a integridade das biomoléculas associadas com a membrana (ALMROTH *et al.*, 2005). A intensidade da peroxidação lipídica pode ser avaliada de acordo com os níveis dos produtos primários ou ainda com os produtos finais da peroxidação, como por exemplo, o malondialdeído (MDA), que é expresso em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006).

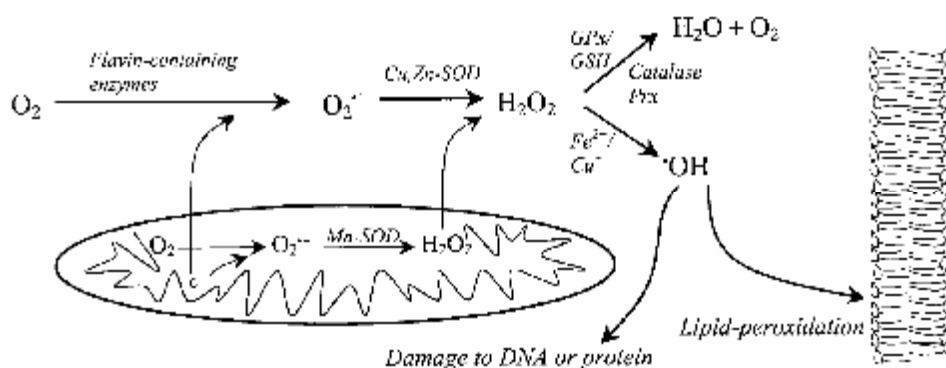


Figura 6: Efeitos das EROs sobre lipídios, proteínas e DNA (adaptado de Nordberg & Arnér, 2001).

Os organismos aeróbicos possuem uma diversidade de defesas antioxidantes para proteger a célula contra os danos ocasionados pela produção de EROs. Os peixes também possuem um sistema antioxidante eficaz (ZHANG *et al.*, 2005, TRENZADO *et al.*, 2006). Porém, existem poucas informações sobre os mecanismos de defesas que neutralizam os impactos das EROs em peixes. O sistema antioxidante pode ser enzimático e não-enzimático. O não-enzimático é composto por substâncias como a glutathiona, o ácido ascórbico, o tocoferol, etc. As enzimas antioxidantes mais reportadas em organismos aquáticos são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathiona peroxidase (GPx) (Figura 7). A glutathiona S-transferase (GST) representa uma importante ferramenta para a detoxificação de xenobióticos. As enzimas CAT e GPx têm papéis complementares na detoxificação do peróxido de hidrogênio, sendo que elas têm diferentes localizações celulares e moléculas alvo (BARATA *et al.*, 2005). A CAT é uma das mais importantes enzimas do sistema antioxidante. Essa enzima se localiza nos peroxissomos e é responsável pela detoxificação do H_2O_2 (ZHANG *et al.*, 2005). Quando sua atividade aparece

aumentada em determinados tecidos de peixes, isso pode significar uma possível resposta compensatória do organismo a insultos oxidativos. As glutathione S-transferases incluem três famílias de enzimas (citosólica, mitocondrial e microsomal), que estão envolvidas na detoxificação de muitos xenobióticos e ainda tem um importante papel na proteção dos tecidos contra situações de estresse oxidativo. Este multicomponente enzimático possui um potente efeito protetor contra as EROs (MASELLA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005). A avaliação da GST tem sido bastante reportada em peixes como bioindicador na avaliação de impacto ambiental em peixes (AHMAD *et al.*, 2000; PEIXOTO *et al.*, 2006; YI *et al.*, 2007). Estudos mostram que quando as enzimas CAT e GST apresentam aumento de suas atividades em tecidos de peixes, elas podem ser usadas como indicadores de exposição aos poluentes aquáticos como os pesticidas (AHMAD *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2003, MORAES *et al.*, 2007).

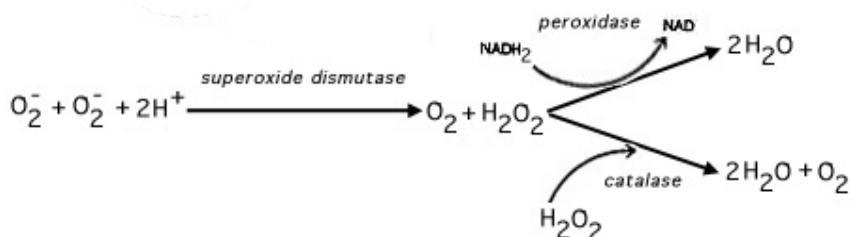


Figura 7: Sistema antioxidante: disponível em <http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/oxygen.jpg>

4 RESULTADOS

4.1 Manuscrito 1

Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to carbofuran in a rice field condition

Bárbara Estevão Clasen^a, Vania Lucia Loro^{a*}, Roberta Cattaneo^a, Bibiana Silveira Moraes^a, Charlene Cavalheiro de Menezes^a, Adriana Santi^a, Alexandra Pretto^a and Renato Zanella^b

Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to carbofuran in a rice field condition

Bárbara Estevão Clasen^a, Vania Lucia Loro^{a*}, Roberta Cattaneo^a, Bibiana Silveira Moraes^a, Charlene Cavalheiro de Menezes^a, Adriana Santi^a, Alexandra Pretto^a and Renato Zanella^b

^a Laboratório de Bioquímica Adaptativa, Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

^b LARP – Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding Author:

(*) Dr. Vânia Lucia Loro.

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55 –220-9456

Fax: 55 (55) 220-8240

E-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

The present study investigated carbofuran effects in *Cyprinus carpio* maintained in rice field conditions for 7, 30 or 90 days. Antioxidant profile and oxidative stress parameters were evaluated. The carbofuran caused an increase in hepatic CAT activity after 30 days of exposure. Conversely, the GST activity in liver was decreased after seven and 90 days, but increased after 30 days. The protein carbonyl was reduced in all exposure times. The levels of TBARS in liver and muscle showed increased after 30 and 90 days of exposure to carbofuran. Brain exhibited an increased on TBARS in all investigated periods of exposure to carbofuran in rice field conditions. These results suggest that environmental relevant concentration of carbofuran has a toxic effect on tissues of *C. carpio* by induces oxidative stress and that oxidative stress can be considered a biomarker of toxicity carbofuran-induced.

Keywords: Carbamate, insecticide, oxidative stress, fish.

INTRODUCTION

Dependence on pesticides has been increasing since the onset of the green revolution in agriculture. This phenomenon is especially seen in tropical areas as Brazil where agriculture has increased dramatically over the last decades (Suchahyo *et al.*, 2008). Pesticides are substances widely used in current agricultural practices and have become necessary to ensure increased productivity through the pest control. However, owing to the toxic effects on non-target organisms, including fish, most pesticides may produce serious detrimental effects on ecosystems (Bretraud, 2000; Adhikari *et al.*, 2004; Senger *et al.*, 2005).

Carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzo-furanyl methylcarbamate) is an carbamate insecticide and is being used extensively in rice fields to control rice pests. Contamination of water bodies adjacent to rice fields by carbofuran, mainly through run off, is quite possible. Carbofuran is a broad spectrum systemic insecticide, nematicide, and acaricide commonly used throughout the world. Because to its widespread use in agriculture and relatively good solubility in water (320 mg/L), carbofuran can contaminate surface and ground waters and therefore carries a risk to various consumers, as well as the environment. Carbofuran has a half-life of 138 days in field soil and carbofuran is very toxic to rat and fish tissues (Bretraud *et al.*, 2000; Begum, 2004; Brkić *et al.*, 2008).

Many environmental pollutants have oxidative stress inducing effect in fish. Regarding to carbofuran, recent studies have showed that carbofuran induces oxidative stress leading to generation of free radicals, with the increase of reactive oxygen species (ROS) and, alteration in antioxidant profile (Banerjee *et al.*, 1999). Consequently, ROS can attack multiple cellular constituents, including proteins,

nucleic acids, and lipids. To combat the damaging actions of ROS, organisms developed multiple systems of antioxidant defense. The antioxidant system includes high-molecular weight enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx). An imbalance between the oxidizing processes and the antioxidant defense systems of an organism cause oxidative stress (Halliwell & Gutteridge, 1989; Bagnyukova *et al.*, 2005). Some biochemical perturbations resulting from oxidative stress include lipid peroxidation and protein carbonyl formation (Almroth *et al.*, 2005). Lipid peroxidation in fish, measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) has been suggested as one of the molecular mechanisms involved in pesticide-induced toxicity (Banerjee *et al.*, 1999). Another oxidative stress indicator is the protein carbonyl. Carbonyl formation has been used as biomarker of exposure to pesticides in fish. The oxidizable lipids may attack nearby proteins causing the formation of an excess of protein carbonyl (Almroth *et al.*, 2005). In fish there is little information about changes in oxidative stress parameters after exposure to agrochemicals like carbofuran. Considering the potential contaminant of pesticides used in agriculture practices and possible contamination of fish, this study examined the effects of carbofuran at environmental relevant concentrations on oxidative stress parameters in tissues of *Cyprinus carpio*. An attempt has also been made to assess usefulness of these parameters as biomarkers of exposure to carbofuran, due to economical importance of this freshwater fish.

MATERIALS AND METHODS

EXPERIMENTAL DESIGN

Cyprinus carpio juveniles with an average weight of 20.0 ± 1.0 g and length 10.0 ± 1.0 cm were obtained from a fish farm (RS, Brazil). The fish were acclimated for 10 days to laboratory conditions, 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 acclimation the experiment was carried out in the ponds of a rice paddy field, with the fish trapped in submersed cages, measuring 0.30 m (diameter) x 1.05 m (length). Fish were exposed to carbofuran for 7, 30 and 90 days.

The experimental design used was a randomized block design with three replications (ponds). Fifteen fishes per pond were exposed for 7, 30 and 90 days to the treatments. The treatments included three ponds with the commercial insecticide containing carbofuran (100 g/Kg) and a control without insecticide application (control). Insecticide was added to the water at the beginning of the experiment. The concentration of commercial insecticide containing carbofuran in rice field was measured after 0, 7, 14, 21, 28, 45 and 90 days using high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) after a solid phase extraction using C18 (500 mg). This method was described by Zanella et al., (2003). The rice paddy water, during experimental period (90 days) had the following average parameters: temperature 24 ± 2.0 °C, pH 6.5 ± 0.2 units, dissolved oxygen 4.21 ± 2.0 mg/L, nonionized ammonia 0.8 ± 0.01 µg/L, nitrite 0.06 ± 0.01 mg/L. During the experimental period fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Purina, Brazil) during both acclimation and exposure period.

After the experimental period (7, 30 and 90 days), five fish per tank (n=15) were collected and placed in recipients with ice for 5 min for anesthetizing. Tissues (brain, muscle and liver) were then removed, weighed separately, and immediately frozen at -70°C for posterior analysis.

CHEMICALS

A commercial formulation of the insecticide carbofuran - 2,3-dihydro-2,2-dimetil-7-benzofuranyl metylcarbamate (Furadan 100 g – FMC Química do Brasil Ltda) was used in the experiment. 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).

OXIDATIVE STRESS PARAMETERS

Catalase activity assay

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson & Kiesov, 1972). Samples of liver tissue (50 mg) were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (with 0.1% Triton X-100 and 150 mM NaCl) (1:20 dilution), centrifuged at 10 000 X g for 10 min at 4 °C. The assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50mM, pH 7.0), 0.05 mL H₂O₂ (0.3 M) and 0.05 mL homogenate. Change of H₂O₂ absorbance in 60 s was measured at 240 nm. Catalase activity was expressed as µmol/min/mg protein.

Glutathione S-transferase (GST)

GST activity in liver tissue (50 mg) was measured according to Habig *et al.* (1974) using 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate. The formation of S-2, 4-dinitrophenyl glutathione was monitored by the increase in absorbance at 340 nm against blank. The extinction coefficient used for CDNB was 9.6 mM/cm. The activity was expressed as $\mu\text{mol GS-DNB}/\text{min}/\text{mg}$ protein.

Protein Carbonyl assay

The liver tissue (50 mg) 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), and suspended in 1 mL of denaturing buffer and the carbonyl content was measured spectrophotometrically at 370 nm. Assay was performed in duplicate and two tubes blank incubated with 2 N HCl without DNPH was included for each sample. The total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M/cm.

Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation was estimated by TBARS assay, performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which was optically measured. Liver, muscle and brain homogenates (100-400 μ L) were added TCA 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 protein according to Buege & Aust (1978).

Protein determination

Protein was determined spectrophotometrically using bovine serum albumin as standard. Absorbance of samples was measured at 595 nm (Bradford *et al.*, 1976).

STATISTICAL ANALYSIS

Comparison between two groups (control and exposure group) (n=15) was made by Student *t*-test. Value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant for all statistical analyses.

RESULTS

There was an increase in catalase activity in the liver after 30 days of exposure to carbofuran was observed and a lack of response in the other analyzed periods (Fig. 1). Glutathione S-transferase in the liver showed different results

according to period analyzed. Significant GST increase was observed after 30 days of exposure and decreased activity at 7 and 90 days (Fig. 2). Protein carbonyl in the liver decrease significantly in all periods studied (Fig. 3). At the seven days brain TBARS increase significantly in all periods, but no alterations were observed in the liver and muscle tissue in seven days exposure. On the contrary at 30 and 90 days of exposure to carbofuran TBARS levels increased significantly in all tissues studied (Table II).

DISCUSSION

Catalase activity did not modified in our experimental protocol, CAT activity did not alter after 7 and 90 days of carbofuran exposure. CAT is a very important enzyme of antioxidant system that removes the hydrogen peroxide which is metabolized to oxygen and water (Peixoto *et al.*, 2006). However, CAT activity in liver was increased after 30 days of exposure. The increase occurred probably in response to higher hepatic TBARS levels found in this period. Catalase increase is a typical response against pesticide toxicity and the effect showed in the present study could be directly related to carbofuran residues found in water ponds. A significantly increased CAT activity was also observed in some studies after the exposure to different pollutants and pesticides (Ahmad *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004). Monteiro *et al.* (2006) showed an increase in liver CAT activity of *Brycon cephalus* after methyl parathion insecticide exposure. Similarly that in this study *Oreochromis niloticus* exposed to etoxazole for 15 days showed significant alterations on CAT activity in gill and white muscle tissues (Üner *et al.*, 2005). In this study, liver GST

activity was reduced in seven and 90 days of exposure to carbofuran. Different after 30 days GST activity was increased. The induction of GST is considered beneficial to handle a stress condition, but the reduction of activity is little known. Is possible, that the long time of exposure to carbofuran can induces the lack of response in both catalase GST activity. The inhibition of GST enzyme activity in hepatic tissue usually occurs because liver is one of the first organs exposed to pesticides or other pollutants. Regarding to lipid peroxidation we observed an enhanced of TBARS levels in brain after all exposure time. Liver and muscle TBARS increased at 30 days and 90 days of exposure to carbofuran. The results concerning tissue TBARS levels suggesting protective effect of antioxidant system of *C. carpio* during seven days of exposure. The lack of response from hepatic catalase activity probably induces a compensatory mechanism by other antioxidant system. The lipid peroxidation phenomenon was evidenced due to elevation of TBARS levels in brain, liver and muscle after 30 and 90 days of exposure. Our results led us to conclude that the exposure to carbofuran insecticide promotes variations in the MDA concentrations and in the antioxidant systems in different tissues of *C. carpio*. Accordingly, have other authors have observed elevated levels of lipid peroxidation induced by aquatic pollutants (Li *et al.*, 2003, Sayeed *et al.*, 2003). Li *et al.* (2003) observed that TBARS levels increased about 73% in the liver of *Carassius auratus* exposed for 15 days to 0.4 mg/L of 3,4-dichloroaniline, a chemical used in the synthesis of herbicides. The level of lipid peroxidation may differ among fish species and also due to tissue considered. In this study the protein carbonyl levels were reduced in all exposure times and these results are in agreement with those obtained by Almroth *et al.*, (2005), where a decrease in this parameter as observed in eelpout (*Zoarces viviparus*). To best of our knowledge, little work has been done concerning

protein carbonyl in teleost fish especially after long exposure. The existence of an induction of antioxidant system may reflect an adaptation of organisms and explain the reduced levels of protein carbonyl found in the present study.

The present study showed that carbofuran concentrations used in agriculture may cause changes in associated to oxidative stress in *Cyprinus carpio*. The measurement of tissue TBARS levels can be considered a good parameter to monitor insecticide fish toxicity in contaminated water. Thus, any external stressor, such as carbofuran, even at non-lethal concentration can have a toxic effect on the *C. carpio* oxidative parameters. The increased TBARS levels might have resulted from an increase of free radicals as a result of fish stress condition after carbofuran intoxication.

We thank the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) for the support and the facilities, CNPq/CT-HIDRO 552.546/2007-0 for the financial support, CNPq for the student Assistantship for Bárbara Clasen and Research fellowship to Vania Lucia Loro. The investigation was authorized by the board on experimentation on Animals of the Federal University of Santa Maria, reference number: 23081.010369/2007-58.

References

- Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T. & Ayyappan, S. (2004). Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology Environmental Safety* **58**, 220-226.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M. & Raisuddin, S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1523**, 37-48.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A. & Förlin, L. (2005). Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology* **73**, 171-180.
- Bagnyukova, T.V., Vasyukiv, O.Y., Storey, K.B. & Lushchak, V.I. (2005). Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain research* **1052**, 180-186.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T. & Chakraborty, A.K. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters* **107**, 33-47.
- Begum, G. (2004). Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. *Aquatic Toxicology* **66**, 83-92.
- Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology* **52**, 302-309.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Bretaud, S., Toutant, J.-P. & Saglio, P. (2000). Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology Environmental Safety* **47**, 117-124.
- Brkić, D.V., Vitorović, S.L., Gašić, S.M. & Nešković, N. K. (2008). Carbofuran in water: subchronic toxicity to rates. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **25**, 334-341.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* **249**, 7130-7139.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1989). Free radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford University Press.
- Li, W., Yin, D., Zhou, Y., Hu, S. & Wang, L. (2003). 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology Environmental Safety* **56**, 251-255.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T. & Kalinin, A.L. (2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology C* **143**, 141-149.
- Nelson, D.P. & Kiesow, L.A. (1972). Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Analytical Biochemistry* **49**, 474-478.

- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D. & Fontainhas-Fernandes, A. (2006). Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **85**, 91-96.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S. Bin-Hafeez, B., Haque, R. & Raisuddin, S. (2003). Oxidative biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 295-301.
- Senger, M. R., Rico, E. P., Arizi, M. B., Rosemberg, D. B., Dias, R. D., Bogo, M. R. & Bonan, C. D. (2005). Carbofuran and Malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology* **212**, 107-115.
- Sucahyo, D., Straalen, N.M., Krave, A. & Gestel, A.M. (2008). Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp *Cardina laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **69**, 421-427.
- Üner, N., Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H. & Usta, D. (2005). Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **21**, 241-245.
- 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.
- Yan, L.J., Traber, M.G. & Packer, L. (1995). Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Analytical Biochemistry* **228**, 349-351.

Table I: Concentration ($\mu\text{g/L}$) of carbofuran in rice field after 0, 7, 14, 21, 28, 45 or 90 days.

Time (days)	0	7 ^o	14 ^o	21 ^o	28 ^o	45 ^o	90 ^o
Concentration ($\mu\text{g/L}$)	3.6	3.3	2.7	2.5	2.0	nd	nd

Table II: Lipid peroxidation measured throughout TBARS levels (nmol MDA/mg of protein) in brain, liver and muscle of *Cyprinus carpio* exposed to carbofuran.

Time (days)	Brain		Liver		Muscle	
	Control	treatment	control	treatment	Control	treatment
7	3.83 ± 0.5	7.83 ± 0.82*	1.85 ± 0.7	1.51 ± 0.88	0.83 ± 0.5	0.69 ± 0.32
30	4.26 ± 0.6	11.98 ± 0.07*	1.61 ± 0.2	1.95 ± 0.3*	0.82 ± 0.09	0.97 ± 0.13*
90	4.04 ± 0.4	10.44 ± 1.5*	1.73 ± 0.8	2.30 ± 0.83*	0.86 ± 0.12	1.17 ± 0.23*

* Indicate significant difference between carbofuran group treatment and control values ($P \leq 0.05$).

FIGURE CAPTIONS

Fig.1 Liver catalase (CAT) activity in *Cyprinus carpio* exposed to carbofuran (3.6 µg/L) at rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean ± SD (n=15). *Indicates significant difference between control and insecticide group ($p \leq 0.05$).

Fig.2 Liver glutathione S-transferase (GST) activity in *Cyprinus carpio* exposed to carbofuran (3.6 µg/L) at rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean ± SD (n=15). *Indicates significant difference between control and insecticide group ($p \leq 0.05$).

Fig.3 Liver protein carbonyl in *Cyprinus carpio* exposed to carbofuran (3.6 µg/L) at rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean ± SD (n=15). *Indicates significant difference between control and insecticide group ($p \leq 0.05$).

Figure 1

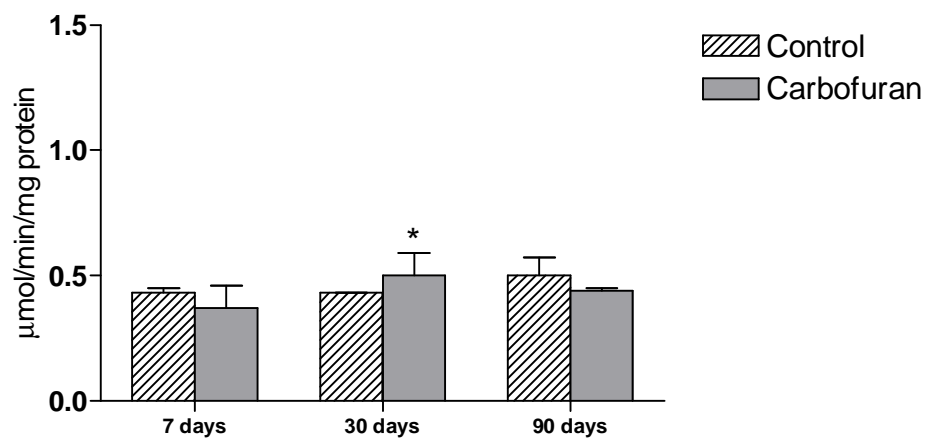


Figure 2

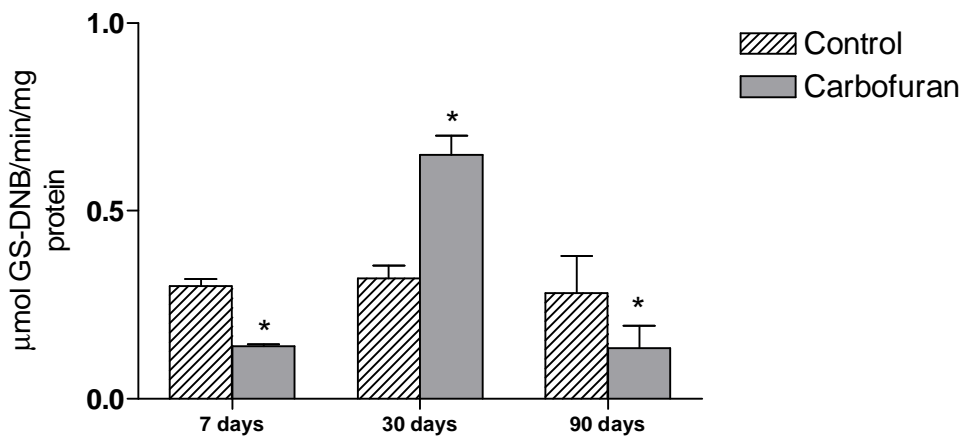
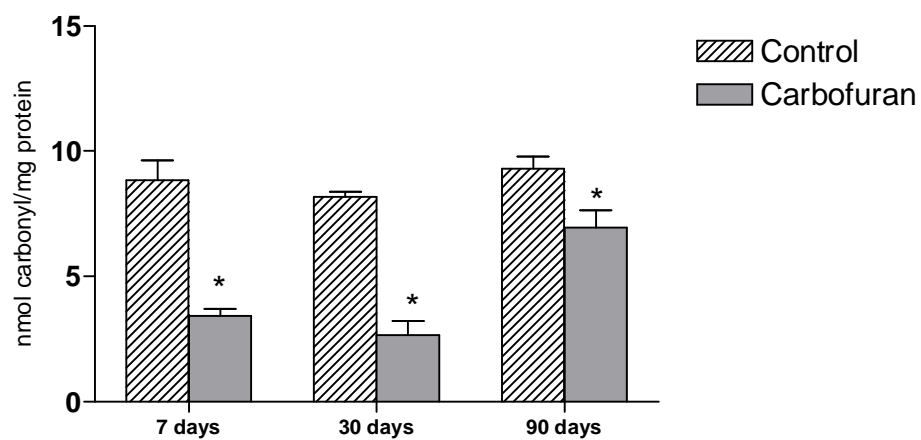


Figure 3



4.2 Manuscrito 2

***Cyprinus carpio* responses after exposure to insecticide fipronil at rice field condition**

Bárbara Clasen^a, Vania Lucia Loro^{a*}, Roberta Cattaneo^a, Charlene C. de Menezes^a, Luis Antonio de Avila^b, Adriana Santi^a, Renato Zanella^c, Geovane Boschmann Reimche^b.

***Cyprinus carpio* responses after exposure to insecticide fipronil at rice field condition**

Bárbara Clasen^a, Vania Lucia Loro^{a*}, Roberta Cattaneo^a, Charlene C. de Menezes^a, Luis Antonio de Avila^b, Adriana Santi^a, Renato Zanella^c, Geovane Boschmann Reimche^b.

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

^b Departamento de Fitotecnia, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.

^c LARP – Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding Author:

(*) Dr. Vânia Lucia Loro.

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55 –220-9456

Fax: 55 (55) 220-8240

E-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

This study investigates *Cyprinus carpio* exposed to fipronil at rice field conditions for 7, 30 or 90 days. Oxidative stress parameters and antioxidant profile were evaluated. Liver, brain and muscle TBARS levels enhanced in all periods of exposure in rice field. Liver catalase activity was inhibited in seven, 30 and 90 days. No alterations were observed in Glutathione S-Transferase activity during experimental periods. Protein carbonyl only increased after 30 days of exposure to fipronil. This study pointed out effects of insecticide fipronil at environmentally relevant concentrations on toxicological parameters associated to oxidative stress in *Cyprinus carpio* in different tissues.

KeyWords: biomarkers, protein carbonyl, antioxidants, insecticide, fipronil

Introduction

Fipronil is a broad-spectrum insecticide that belongs to phenylpyrazole class of pesticides. These insecticides have been marketed recently and are considered more selective and less damaging to ecosystems compared to the organophosphate insecticides. Since its introduction, fipronil has been used on rice, corn and cotton cultures (US Environmental Protection Agency, 1996; Stark and Vargas, 2005). Fipronil toxicity occurs by interference with the passage of chloride ions through the gamma-amino butyric (GABA) receptors, effectively blocking the chloride channel and result in paralysis (Wirth et al., 2004; Tan et al., 2008). The toxicity of fipronil to insects is well-documented, while little is known about the physiological and behavioral effects on fish of sublethal doses of fipronil (Faouder et al., 2007).

Many pesticides are responsible for causing oxidative stress in aquatic organisms, since these contaminants may induce the formation of reactive species and alterations in the antioxidant system (Üner et al., 2005). The oxidative stress also can cause lipid peroxidation (LPO). LPO in fish may be measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and has been used as a biomarker of toxicity in a large number of studies (Almroth et al., 2005; Oruç and Usta, 2007). The oxidative stress is able of generate hydroxyl radical (OH^{\bullet}), that is considered responsible for the formation of carbonyl groups in proteins (Parvez and Raisuddin, 2005). When oxidative stress occurs, fish cells combat it using the antioxidant systems, which includes enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Indeed, Glutathione S-Transferase is a group of multifunctional enzymes that catalyze the conjugation of GSH with a variety of electrophilic metabolites, which are involved in the detoxification of xenobiotics (Monteiro et al., 2006).

Cyprinus carpio, a native fish of Eastern Europe and Western Asia and widely distributed in Brazil, is an omnivorous species that feeds on invertebrates, plants, algae, consume insects larvae and crustaceans and can feed, also, of small fish (Querol et al, 2005). At best of our knowledge few studies are found in the literature concerning the potential effect of pesticides like fipronil on aquatic organisms (Kolaczinski and Curtis, 2001; Schlenk et al., 2001; Chaton et al., 2002; Stark and Vargas, 2005). Thus, considering the economic importance of carps and the possible toxic effects of fipronil the aim of this study was to examine under rice field conditions the effects of sublethal concentrations of fipronil on oxidative stress parameters of *C. carpio*.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The commercial formulation of the insecticide used is (\pm)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinyl – pyrazole-3-carbonitrile (0.65 mg/L). The trade name used in the Brazilian Market is Standak 250[®] (BASF). 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).

2.2 .Fish

Cyprinus carpio weighting 20.0 ± 1.0 g and measuring 12.0 ± 1.0 cm of 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 acclimation fish were divided in groups according with description above. Both, in the period of acclimation and in the period of exposure, the fish were fed twice a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). This work and experiments were approved by the board on experimentation on animals of the Federal University of Santa Maria. Reference number: 23081.010369/2007-58. The insecticide concentrations in water were measured using high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) after a solid phase extraction using C18 (500 mg). This method was described by Zanella et al. (2003) and data are in Table 1.

2.3 .Experimental design

Fish were allocated in 2 groups (in triplicate) of 15 animals distributed per tank. There were the control tanks (without insecticide) (3) and treatment tanks (with fipronil) (45 fish per treatment). The fipronil concentration was 0.0 (control) or 0.65 mg/L, for a 7, 30 or 90 days. The experiment was carried out in a rice paddy field, with the fish trapped in submersed cages, measuring 0.30 m (diameter) x 1.05 m (length). Insecticides concentration in water was monitored from the first day until it was not detected. During all experimental period (90 days) in rice field the average of water parameters were: temperature 22.5 ± 2.0 °C, pH 6.4 ± 0.2 units, dissolved oxygen 4.2 ± 2.0 mg/L, nonionized ammonia 0.8 ± 0.01 µg/L, nitrite 0.06 ± 0.01 mg/L. After each exposure period (7, 30 and 90 days), a sample of 5 individuals were taken from the tanks and then submitted to blood and tissues (brain, liver and white muscle) samples.

2.4 .Catalase activity assay

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesov 1972). Liver tissue (50 mg) were 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 H₂O₂ (0.3 M) and 0.05 mL homogenate. Change of H₂O₂ absorbance in 60 s was measured by at 240 nm. Catalase activity was calculated and expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein.

2.5. Carbonyl assay

The liver tissue (60 mg) 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), and suspended in 1 mL of denaturing buffer and the carbonyl content was measured spectrophotometrically at 370 nm. Assay was performed in duplicate and two tubes blank incubated with 2 N HCl without DNPH was included for each sample. The total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 M/cm.

2.6. *Glutathione S-transferase (GST)*

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

2.7. *TBARS assay*

Lipid peroxidation was estimated by a TBARS assay, performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which was optically measured. Liver, muscle and brain (100-400 μL) were homogenized in a phosphate- K^+ buffer (20 mM) and after were added TCA 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 $^{\circ}\text{C}$. After cooling, it was centrifuged at 5,000 $\times g$ for 15 min and optical density was measured by spectrophotometer at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmols MDA/mg protein according to Buege & Aust (1978).

2.8. *Protein determination*

Protein was determined according to Bradford et al. (1976) method using bovine serum albumin as standard. Absorbance of samples was measured at 595 nm.

2.9. Statistical procedures

Comparison between control and insecticide exposure group was made using Student *t*-test. Value of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant for all analyses. All statistical analyses were carried out using the Statistic 5.1 software for windows. Were collected five fish of each tank (triplicate), thus the “n” number was 15.

3. Results and Discussion

Oxidative stress parameters such as reactive substances to tiobarbituric acid (TBARS) significantly increased in all tissues tested (brain, liver or muscle) in all exposure periods (Table2). The results concerning tissue TBARS clearly indicate a lipid peroxidation phenomenon probably generated by fipronil exposure. Accordingly, in a similar study carried out in our laboratory fish exposed to quinclorac, propanil and metsulfuron methyl showed lower TBARS levels in brain and muscle tissues. Was observed TBARS increased in the liver of fish tissue after clomazone and propanil exposure (Moraes et al., 2007). Thus, oxidative damage has been recorded in fish after rice pesticides exposure. Results concerning brain TBARS showed in this study could be due to high susceptible to oxidative damages and lipid peroxidation of this organ. Brain tissue has a low antioxidant defense system and high contents of polyunsaturated fatty acids in cell membrane. Many hypothesis have been formulated to explain pesticides induced -lipid peroxidation, and this response varies depending of tissue considered, fish, time of exposure and pesticide class. In fact, Üner et al. (2005) observed that the short-time exposure of *Oreochromis niloticus* to etoxazole insecticide did not nduce alterations in muscle TBARS levels. In this way,

the lipid peroxidation observed in our experimental protocol could be considered a tissue specific response to long-term exposure.

Protein carbonyl levels increased after 30 days of fipronil exposure levels (Fig.1). An increase in protein carbonyl levels, compared to control, also can be considered a biomarker of pesticide exposure, where a decrease in protein carbonyl levels may indicate that the susceptibility to proteolytic degradation has been increased by mild oxidation of proteins. The results of present study are in agreement with Parvez and Raisuddin (2005) that found protein carbonyl levels increased in liver, kidney, gill and muscle of *Channa punctata* after exposure to deltamethrin, endosulfan or paraquat. This oxidative modification of proteins is also one of the many consequences of oxidative stress in fish. The sum of results concerning TBARS and protein carbonyl increase at 30 days of exposure pointed out the oxidative stress phenomenon that fish developed in response to fipronil exposure.

Catalase (CAT) activity decreased in the hepatic tissue after seven, 30 and 90 days of exposure of fishes to fipronil (Fig.2). Accordingly, a reduction in catalase activity was observed in the liver of silver catfish exposed to clomazone (0.5 or 1.0 mg/L) for 12, 24 and 96 h (Crestani et. al., 2007) and decrease in liver tissue of *Channa punctatus* after 48 hours of exposure to deltamethrin insecticide (Sayeed et. al., 2003). This decrease in CAT activity observed in this study could be due to the flux of the superoxide radicals, which have been reported to inhibit CAT activity. These results are in accordance to Ballesteros et al. (2009) where the activity of catalase was inhibited after exposure to endosulfan insecticide for 24 and 48 hours. The decreased CAT activity of catalase in the liver of fishes indicate a reduced capacity to scavenge the H_2O_2 produced in this tissue. Thus, the inhibition observed

in this important antioxidant enzyme may be directly linked with oxidative stress development in tissues of carps after prolonged exposure to fipronil.

No changes were observed in activity of GST on evaluated tissue (Fig.3). This results are according to Oruç & Üner (2000), where 2,4 D, azinphosmethyl and their mixtures did not affect the activity of GST in *Carassius auratus*. The unchanged GST activity after insecticide exposure indicates the inactivation of GST by this pesticide or GSH depletion, which induces GST to lose its activity. In addition when *Carassius auratus* were exposed during 40 days to 2,4 dichlorophenol no differences were observed in liver GST activity (Zhang *et al.*, 2004). However, the most commonly found effect of pesticide toxicity is the inhibition of enzyme activity. The GST inhibition by pesticides was found in liver of *Ciprinus carpio* (Moraes *et al.*, 2009) and in liver of *Ancistrus punctatus* exposed to deltamethrin insecticide (Pimpão *et al.*, 2007).

Fipronil residues were found until 45 days after the first application and this fact could help to explain results obtained in fish tissues. The long time (30-90 days) of exposure of this study could contribute to responses observed in fish tissues. Besides, fipronil detection in water was only until 45 days (Table 2). Thus, the changes observed at long time exposure could be a clear indicative that any damage initiated in beginning of exposure time persists until 90 days. The pattern of response depends of the parameter analyzed, time of exposure of fipronil residues in fish tissues. The present study showed that at concentrations used in rice field fipronil is potentially toxic to *Cyprinus carpio*. Moreover, the evaluation of TBARS and protein carbonyl can be considered to early biomarker to fipronil toxicity in carps.

References

- Almroth, B.C., 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.
- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenyssia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 199-205.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-309.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chaton, P.F., Ravanel, P., Tissut, M. Meyran, J.C., 2002. Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with subalpine mosquito breeding sites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 8-12.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, dos S. D., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R. & Loro, V.L., 2007. Effects of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver satfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67, 2305-2311.
- Faouder, J., Bichon, E., Brunschwig, P., Landelle, R., Andre, F., Le Bizec, B., 2007. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. *Talanta* 73, 710-717, 2007.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

- Kolaczinski, J., Curtis, C., 2001. Laboratory evaluation of fipronil, a phenylpyrazole insecticide, against adults *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and investigation of its possible cross-resistance with dieldrin in *Anopheles stephensi*. *Pest. Manag. Sci.* 57, 41-45.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T. & Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 141-149.
- Moraes, B.S., Loro, V.L., Glusczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E., Machado, S. O., 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 68, 1597-1601.
- Moraes, B.S., Clasen, B., Loro, V.L., Pretto, A., Toni, C., Avila, L. A., Marchezan, E., Machado, S. O., Zanella, R., Reimche, G.B., 2009. Toxicological responses in different organs of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* DOI: 10.1016/j.ecoenv.2009.05.013. *In Press*.
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 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.
- Oruç, E.O. & Üner, N., 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 127, 291-296.

- Oruç, E, Ö., Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. Environ. Toxicol. Pharm. 23, 48-55.
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). Environ. Toxicol. Pharm. 20, 112-117.
- Pimpão, C.T., Zampronio, A.R. & Silva de Assis, H.C., 2007. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). Pest. Biochem. Physiol. 88, 122-127.
- Querol, M. V. M., Querol, E., Pessano, E. F. C., Azevedo, C. L.O., 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, Uruguaiana, 3, 21-23.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S. Bin-Hafeez, B., Haque, R. & Raisuddin, S. (2003). Oxidative biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 295-301.
- Schlenk, D., Huggett, D.B., Allgood, J., Bennett, E., Rimoldi, J., Beeler, A.B., Block, D., Holder, A.W. Hovinga, R., Bedient, B., 2001. Toxicity of fipronil and its degradation products to *Procambus* sp.: field and laboratory studies. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41, 325-332.
- Stark, J.D., Vargas, R.I., 2005. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 62, 11-16.
- Tan, H., Cao, Y., Tang, T., Qian, K., William L., Li, J., 2008. Biodegradation and chiral stability of fipronil in aerobic and flooded paddy soils. Sci. Tot. Environ. 401, 428-437.

- US EPA, 1996. Pesticide Fact Sheet: Fipronil. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. Washington, DC. EPA-737-F-96-005, 8 pp.
- Üner, N., Oruç, E.O , Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H., Usta, D., 2005. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. Environ. Toxicol. Pharmac. 21, 241-245.
- Wirth, E.F., Pennington, P.L., Lawton, J.C., DeLorenzo, M.E., Bearden, D., Shaddrix, B., Siversten, S. Fulton, M.H., 2004. The effects of the contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. Environ. Pol. 131, 365-371.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. Anal. Biochem. 228, 349-351.
- Zanella, R., Primel, E.G, Gonçalves, F.F., Kurz, M. H.S., Mistura, C.M., 2003. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agricultural waters. J. Sep. Sci. 26, 935-938.
- 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.

FIGURE CAPTIONS

Fig.1 Liver protein carbonyl in *Cyprinus carpio* exposed to fipronil (0.65 mg/L) at rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=15).

*Indicates significant difference between control and insecticide group ($p \leq 0.05$).

Fig.2 Liver tissue catalase (CAT) activity in *Cyprinus carpio* exposed to commercial insecticide containing fipronil (0.65 mg/L) in rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=15).

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

Fig.3 Liver glutathione S-transferase (GST) activity in *Cyprinus carpio* exposed to fipronil (0.65 mg/L) at rice field condition after 7, 30 or 90 days. Data represent the mean \pm SD (n=15).

*Indicates significant difference between control and insecticide group ($p \leq 0.05$).

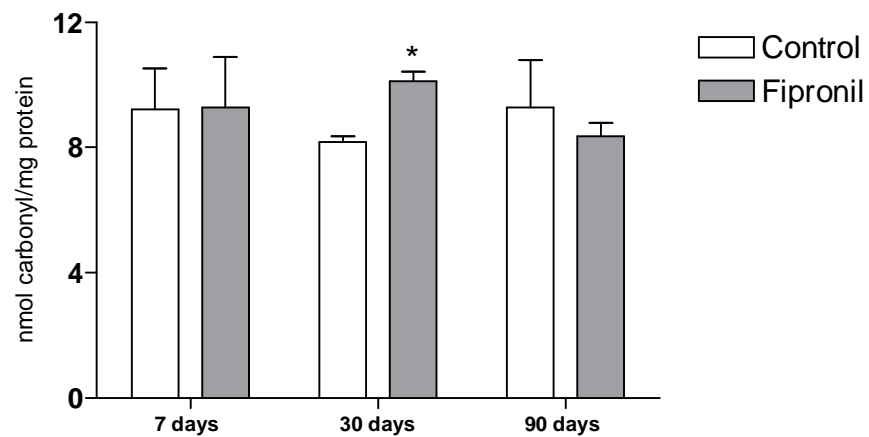


Fig.1

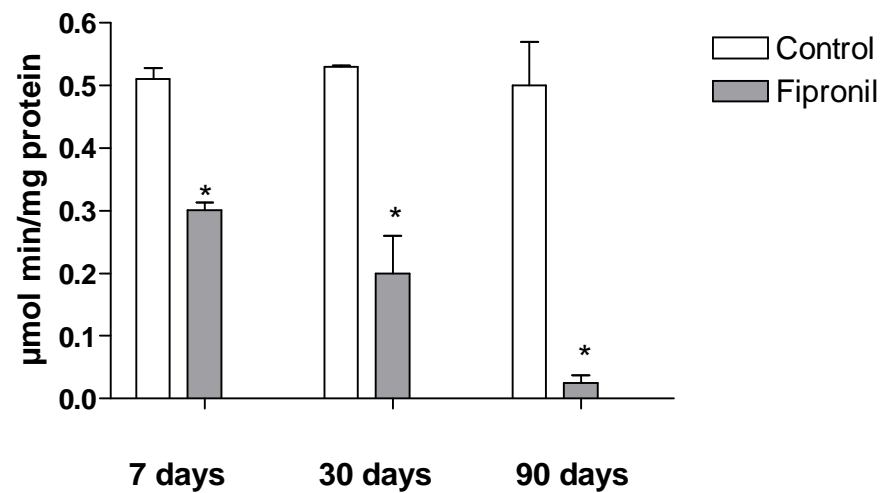


Fig. 2

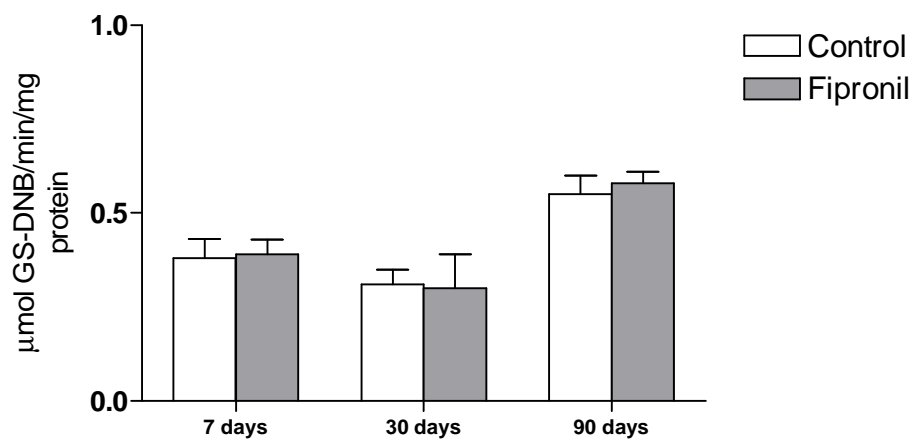


Fig.3

Table 1: Concentration (mg/L) of commercial insecticide containing fipronil in rice field after 0, 7, 14, 21, 28, 45 and 90 days.

	Time (days)						
	0	7 ^o	14 ^o	21 ^o	28 ^o	45 ^o	90 ^o
Concentration(mg/L)	0.65	0.64	0.6	0.5	0.4	0.3	nd

Table 2: Lipid peroxidation measured throughout TBARS levels (nmol MDA/mg of protein) in brain, liver and muscle of *Cyprinus carpio* exposed to fipronil in rice field condition after 7, 30 and 90 days (n=15).

Time (days)	Brain		Liver		Muscle	
	Control	treatment	Control	treatment	control	treatment
First year						
7	4.26 ± 0.6	7.09 ± 0.6*	1.8 ± 0.4	2.38 ± 0.14*	0.83 ± 0.01	0.85 ± 0.01*
30	4.185 ± 0.6	11.46 ± 0.7*	1.61 ± 0.08	2.4 ± 0.7*	0.82 ± 0.09	1.24 ± 0.20*
90	4.31 ± 0.06	15.9 ± 0.04*	1.73 ± 0.09	2.61 ± 0.29*	0.86 ± 0.12	1.08 ± 0.28*

5 DISCUSSÃO

No presente estudo ocorreu lipoperoxidação nos tecidos estudados de carpas expostas aos dois inseticidas comerciais em sistema de lavoura de arroz. Estes resultados indicam claramente que o aumento nos níveis de TBARS provavelmente foi gerado pela produção de estresse oxidativo induzido pelos inseticidas carbofuran e fipronil. O aumento dos níveis de TBARS em tecidos de peixes como um indicativo de estresse oxidativo, já foi demonstrado na literatura por outros autores. Li *et al.* (2003), observaram aumento de 73% nos níveis de TBARS hepáticos de *Carassius auratus* expostos por 15 dias a 0.4 mg/L do pesticida 3,4 dicloroanilina. Moraes *et al.* (2007), também encontraram níveis elevados de TBARS em fígado de carpas expostas aos herbicidas clomazone e propanil em uma condição experimental semelhante à deste estudo.

Outro indicativo importante de estresse oxidativo causado por contaminantes ambientais é a atividade da enzima antioxidante catalase. Nos peixes expostos ao inseticida carbofuran não observou-se alterações significativas na atividade da enzima catalase após sete e 90 dias de exposição. No entanto, aos 30 dias houve um aumento na atividade da enzima no fígado. Quando esta enzima apresenta aumento de sua atividade, significa que está ocorrendo um processo de detoxificação, principalmente na tentativa de evitar ou minimizar a formação de EROS nos tecidos. Aumento da atividade da catalase é uma resposta típica contra toxicidade por pesticidas e estes efeitos mostrados no presente estudo podem estar relacionados aos resíduos de carbofuran encontrados na água da lavoura de arroz. Um aumento significativo na atividade da enzima catalase foi observado em alguns estudos após a exposição a diferentes poluentes ambientais (AHMAD *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2004). Monteiro *et al.* (2006) observaram resultados similares quando *Brycon cephalus* foram expostos ao inseticida metil paration (Folisuper 600). Entretanto, em carpas expostas ao inseticida fipronil a atividade da enzima catalase diminuiu no tecido hepático após sete, 30 ou 90 dias de exposição. Crestani *et al.* (2007) também observaram uma diminuição na atividade da enzima catalase em fígado de jundiás após exposição ao herbicida clomazone (0,5 e 1,0 mg/L). A diminuição encontrada na atividade da enzima catalase em jundiás foi relacionada com o aumento de TBARS encontrado no tecido hepático (CRESTANI *et al.*, 2007). A

inibição observada nesta importante enzima antioxidante parece estar diretamente ligada ao desenvolvimento de estresse oxidativo em tecidos de carpas após exposição prolongada. Resíduos de fipronil foram encontrados até 45 dias após a primeira aplicação e este fator pode ajudar a entender os mecanismos desenvolvidos pelos tecidos dos peixes na tentativa de sobreviver em água contaminada.

A enzima glutathione S-transferase também tem um importante papel no processo de detoxificação de xenobióticos. A indução da GST é considerada benéfica reduzida em uma condição de estresse oxidativo, mas o efeito da sua atividade é pouco conhecida. Aos sete ou 30 dias de exposição à formulação comercial do carbofuran, a atividade desta enzima foi diminuída. Porém, após 90 dias de exposição, a atividade da enzima foi significativamente aumentada. Ballesteros *et al.* (2009) também encontraram uma diminuição na atividade da GST em fígado, músculo e brânquias de *Jenynsia multidentata* expostas ao inseticida endossulfan (0,014 a 1,4 µg/L). Exposição prolongada ao carbofuran induziu a falta de resposta na atividade da catalase e reduzir a atividade da GST, como ocorreu neste estudo nos peixes expostos por sete e 90 dias ao inseticida carbofuran. Já nos peixes expostos ao inseticida fipronil nenhuma alteração na atividade da GST foi observada em todos os períodos analisados. A carbonilação de proteínas também foi avaliada no presente estudo. Observou-se diminuição da proteína carbonil em fígado de carpas expostas ao inseticida carbofuran em todos os períodos testados. Existem poucos trabalhos com determinação de proteína carbonil em peixes, especialmente após exposição prolongada. A existência de uma indução do sistema antioxidante devido à exposição aos pesticidas pode refletir uma adaptação dos organismos e explica os níveis reduzidos de proteína carbonil encontrados no presente estudo. Nos peixes expostos ao inseticida fipronil após sete ou 90 dias de exposição, nenhuma alteração nos níveis de proteína carbonil foi encontrado. Entretanto, aos 30 dias de exposição ocorreu um aumento significativo nestes níveis. A carbonilação de proteínas também é um indicativo de estresse oxidativo e tem sido usado em peixes como biomarcador de contaminação por diferentes poluentes. Um aumento nos níveis de proteína carbonil, em comparação com referências, pode ser um biomarcador de exposição a pesticidas. Parvez & Raisuddin (2005) também observaram um aumento de carbonilação de proteínas em *Channa punctatus* expostos a diferentes pesticidas.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as concentrações de carbofuran e fipronil usadas na agricultura podem causar alterações nos parâmetros toxicológicos em *Cyprinus carpio*. De fato, a diminuição observada nos níveis de proteína carbonil em tecido hepático pode ser considerada um biomarcador à exposição ao inseticida carbofuran, assim como, a diminuição da atividade da enzima catalase para exposição ao inseticida fipronil. Os elevados níveis de TBARS podem ser considerados biomarcadores para acompanhar a toxicidade de peixes em água contaminada por ambos inseticidas. Em resumo as alterações encontradas na atividade das enzimas catalase e glutathione S-transferase e nos níveis de TBARS e carbonilação de proteínas podem indicar uma resposta do peixe frente à possível toxicidade causada pelos inseticidas. Ocorreu dano oxidativo nos tecidos das carpas após a exposição a ambos inseticidas comerciais e períodos de exposição testados. Assim, o uso destes inseticidas mesmo em baixas concentrações, por alterar os mecanismos antioxidantes destes peixes e deve ser cuidadosamente avaliado.

6 CONCLUSÕES

- As formulações comerciais dos inseticidas estudados provocam alterações na atividade da enzima catalase no tecido hepático indicando um possível dano oxidativo causado pela exposição a ambos inseticidas.
- A enzima glutathione S-transferase também apresentou modificações em sua atividade, indicando uma possível resposta detoxificante frente à intoxicação causada pelo carbofuran. No entanto, nos peixes expostos ao inseticida fipronil a enzima não se alterou durante todos os períodos experimentais.
- O aumento na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em diferentes tecidos de carpas e as alterações dos níveis de carbonilação de proteínas hepáticas deste peixe evidenciam uma situação de estresse oxidativo. As alterações observadas na atividade da enzima catalase e glutathione S-transferase também evidenciam uma resposta ao dano oxidativo causado pela exposição aos inseticidas comerciais testados.
- Através dos parâmetros analisados e dos resultados obtidos, podemos determinar a carbonilação de proteínas como biomarcador a exposição ao carbofuran. A atividade da enzima catalase pode ser considerada biomarcador para toxicidade ao fipronil e os níveis de TBARS em cérebro, músculo e fígado como biomarcadores de toxicidade a ambos inseticidas avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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. **Biochim et Biophys Acta**, v.1523, p. 37-48, 2000.

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

ALVES, S. R. C., SEVERINO, P. C. Ib botson, D. P., SILVA, A. Z. LOPES, F. R. A. S., SÁENZ, L.A. & BAINY, A. C. D. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. **Marin Environ Res**, v. 54, 241-245, 2002.

BAGNYUKOVA, T.V.; VASYLKIV, O.Y.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. **Brain Res**, v. 1052, p. 180-186, 2005.

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

BALLESTEROS, M.L.; WUNDERLIN, D.A.; BISTONI, M.A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicol Environ Saf**, 72, 199-205, 2009.

BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J.C.; ARUN, S.; PORTE, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comp Biochem Physiol C**, v. 140, p. 175-186, 2005.

BAINY, A.C.D., SAITO, E., CARVELLO, P.S.M., JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquat Toxicol**, v. 34, p. 151-162, 1996.

BOBÉ, A.; MEALLIER P.; COOPER J.; COSTE C.M. Kinetics and Mechanisms of Abiotic Degradation of Fipronil. **J Agric. Food Chem.**, v.46, n.7, p.2834-2839, 1998.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J. P.; SAGLIO, P. Effects of Carbofuran, Diuran, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 47, p. 117-124, 2000.

BRKIĆ, D.V., VITOROVIĆ, S.L., GAŠIĆ, S.M., NEŠKOVIĆ, N. K. Carbofuran in water: subchronic toxicity to rates. **Environ Toxicol and Pharmacol**, v. 25, p. 334-341, 2008.

CAMPBELL, S., DAVID, M. D., WOODWARD, L.A. LI, Q.X. Persistence of carbofuran in marine sand and water. **Chemosphere**, v. 54, p. 1155-1161, 2004.

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

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.

FAOUDER, J., BICHON, E., BRUNSCHWIG, P., LANDELLE, R., ANDRE, F., LE BIZEC, B. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. **Talanta**, v. 73, p. 710-717, 2007.

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

GARCIA DE LLASERA, M.P., BERNAL-GONZALES, M. Presence of carbamate pesticides in environmental waters from the Northwest of Mexico: determination by liquid chromatography. **Water Res**, v. 35, p. 1933-1940, 2001.

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

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. **Marin Pollut Bul**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comp Biochem Physiol B**, v. 44, p. 283-289, 2006.

MAHALAKSHMI, M. BANUMATHI A., PALANICHAMY, M., MURUGESAN, V. Photocatalytic degradation of carbofuran using semiconductor oxides. **J of Hazard Mat**, v. 143, p. 240-245, 2007.

MASELLA, R.; BENEDETTO, R.D.; VARI, R.; FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J Nutr biochem**, v. 16, p. 577-586, 2005.

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

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

MIZE, S.V., PORTER, S.D., DEMCHECK, D.K. Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroninvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA. **Environ Pollut**, v. 152, p. 491-503, 2008.

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

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

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NUNES, G. S., SNTOS, T.C.R., BARCELO, D., PIMENTA, A.S., RIBEIRO, M.L. Extração por fluido supercrítico de alguns inseticidas carbamatos em amostras de batata, com determinação por hplc/fluorescência e confirmação por hplc/espectrometria de massas. **Química Nova**, Vol. 25, p. 214-220, 2002.

OLIVEIRA-SILVA, J.J., ALVES, S.R., MEYER, A., PEREZ, F., SARCINELLI, P.N., MATOS, R.C.O.C., MOREIRA, J.C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Ver Saúde Pub**, v. 35, p. 130-135, 2001.

OROPESA, A.L., GARCIA-CAMBERO, J.P., SOLER, F. Glutathione and malondialdehyde levels in common carp after exposure to simazine. **Environ Toxicol and Pharmacol**, v. 27, p. 30-38, 2009.

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

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

ORUÇ, E. Ö.; USTA, D. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environ Toxicol Pharm**, 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. **Environ. Res.**, v. 79, p. 133-137, 1998.

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

PEI, Z., YITONG, L., BAOFENG, L., GAN, J. J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, v. 54, p. 1691- 1696, 2004.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Pestic Biochem Physiol**, v.85, p. 91-96, 2006.

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

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, Uruguaiana, v. 3, p. 21-23, 2005.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**, 5ª ed. Londrina: IAPAR, 2005, 592p.

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

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. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 56, p. 295-301, 2003.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Med Biol Res**, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SENGER, M. R., RICO, E. P., ARIZI, M. B., ROSEMBERG, D. B., DIAS, R. D., BOGO, M. R. & BONAN, C. D. Carbofuran and Malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. **Toxicology**, v. 212, p.107-115, 2005.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SINGH, N., SETHUNATHAN, N. Degradation of carbofuran by an enrichment culture developed from carbofuran-treated *azolla* plot. **Pestic Sci**, v.55, p. 740-744, 1999.

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

STARK, D. J.; VARGAS I. R. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. **Ecoto. Environ. Safety**. v.62, p.11–16, 2005.

TAN, H., CAO, Y., TANG, T., QIAN, K., WILLIAM L., Li, J. Biodegradation and chiral stability of fipronil in aerobic and flooded paddy soils. **Sci Tot Environ** v. 401, p. 428-437, 2008.

TRENZADO, C.; HIDALGO, M.C.; GARCÍA-GALLEGO, M.; MORALES, A.E.; FURNÉ, M.; DOMEZAIN, A.; DOMEZAIN, J.; SANZ, A. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccari* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. **Aquaculture**, v. 254, p. 758-767, 2006.

US EPA. Pesticide Fact Sheet: Fipronil. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances. Washington, DC. EPA-737-F-96-005, 8 pp, 1996.

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

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*. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.21, p.241-245, 2006.

WILSON, C., TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecol Econ**, v.39, p.449-462, 2001.

WIRTH, E.F., PENNINGTON, P.L., LAWTON, J.C., DELORENZO, M.E., BEARDEN, D., SHADDRIX, B., SIVERSTEN, S. FULTON, M.H. The effects of the contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. **Environ Pol** v. 131, p. 365-371, 2004.

YI, X.; DING, H.; LU, Y.; LIU, H.; ZHANG, M.; JIANG, W. Effects of long-term alachlor exposure on hepatic antioxidant defense and detoxifying enzyme activities in crucian carp (*Carassius auratus*). **Chemosphere**, v. 68, p. 1576-1581, 2007.

ZHANG, J.F.; LIU, H.; SUN, Y.Y.; WANG, X.R.; WU, J.C.; XUE, Y.Q. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. **Environ Toxicol Pharm**, v. 19, p. 185-190, 2005.