



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

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A
FORMULAÇÕES COMERCIAIS DOS HERBICIDAS
GLIFOSATO E CLOMAZONE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Charlene Cavalheiro de Menezes

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM JUNDIÁS
(*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A FORMULAÇÕES
COMERCIAIS DOS HERBICIDAS GLIFOSATO E
CLOMAZONE**

por

Charlene Cavalheiro de Menezes

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

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

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**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

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*) EXPOSTOS A FORMULAÇÕES COMERCIAIS DOS
HERBICIDAS GLIFOSATO E CLOMAZONE**

elaborada por

Charlene Cavalheiro de Menezes

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. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFMS)

Prof. Dr^a. Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti (UFMS)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010.

Dedico este trabalho aos meus pais, que não se contentaram em me presentear apenas com a vida, mas sim em abrir as portas do meu futuro. A vocês que se doaram por inteiro, renunciando seus sonhos em favor dos meus, incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos. Dividam, pois, comigo, os méritos desta conquista, porque ela também lhes pertence..... Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por estar aqui e ter me dado coragem para ir adiante.

Aos meus pais, base da minha vida, que sempre confiaram e acreditaram em mim, obrigada pela educação que me deram.

A minha madrinha lêda (*in memorian*) que foi fundamental com seu apoio em continuar meus estudos, sempre acreditando e apoiando de uma forma ou de outra e fazendo-me acreditar que basta ir atrás do que realmente queremos.

A minha irmã Mariane e meu cunhado Tiago que ao longo da minha caminhada sempre estiveram por perto e de alguma forma me apoiando. Obrigada pelos conselhos e a pela forma diferente que você Tiago me fez ver o mundo a minha volta “nada de reclamar”.

Agradeço a minha grande orientadora Vania Lucia Loro por todo o apoio, ensinamentos de todos estes anos. Não tenho nem palavras para agradecê-la. Obrigada por sua amizade, compreensão e hoje se consegui isto tudo foi por você que continuei, pois na hora que pensei em desistir você estava ali para me dar força.

A Andréia e o Marcelo que são pessoas que muito me apoiaram e estão sempre presente nas minhas realizações ajudando-me e incentivando-me. Obrigada pelo carinho.

A Márcia pelos primeiros ensinamentos no laboratório, pelo incentivo, dedicação e exemplo de pessoa.

A Alexandra e a Bibiana, grandes amigas e colegas sempre dispostas a ajudar, obrigada pelo carinho, amizade. Tenho em vocês um exemplo de dedicação e competência.

A Milene, uma grande colega, que também foi fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade, apoio e disponibilidade sempre.

As amigas e colegas Cândida e Adriana, pela disponibilidade de me ajudarem sempre, pela paciência, apoio, amizade, generosidade, conselhos e ensinamentos que me deram e pela enorme dedicação de vocês.

A amiga e colega Roberta pela amizade, companheirismo e apoio que me deu nas horas mais complicadas. Obrigada pelos momentos de descontração.

As amigas e colegas Bárbara e Daiane pela tranqüilidade, amizade e companheirismo.

A Doti, Thaís, Joseânia, Aracéli, Rita pela amizade, dedicação e ajuda na realização dos trabalhos.

As minhas queridas amigas de apartamento Caroline e Cristiane que tanto nas horas de alegria e descontração como nas horas mais complicadas estão presentes e dispostas a ajudar. Obrigada amigas.

As professoras Maria Rosa Chitolina Schetinger e Cinthia Melazzo de Andrade Mazzanti por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

A UFSM, ao PPGBTOX, aos demais professores, a CAPES pela bolsa concedida, a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

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

PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A FORMULAÇÕES COMERCIAIS CONTENDO GLIFOSATO E CLOMAZONE

AUTORA: CHARLENE CAVALHEIRO DE MENEZES

ORIENTADORA: VANIA LUCIA LORO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2010

O uso de herbicidas tem aumentado na agricultura e na piscicultura para o controle de plantas daninhas, porém o uso indiscriminado pode causar contaminação a organismos, como os peixes. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das formulações comerciais de glifosato e clomazone sobre parâmetros de estresse oxidativo em jundiás (*Rhamdia quelen*). Jundiás foram expostos à: 0 (controle), 0,45 e 0,95 mg/L de glifosato (480 g/L) e 0 (controle), 0,45 e 0,91 mg/L de clomazone (500 g/L) por oito dias e após, transferidos para água sem o herbicida por igual período. Os parâmetros analisados foram peroxidação lipídica através dos níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), carbonilação de proteínas e a atividade de antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), ácido ascórbico e tióis não protéicos. Os resultados mostraram que os peixes expostos ao glifosato apresentaram aumento nos níveis de TBARS em fígado e músculo na maior concentração, enquanto que no cérebro este aumento foi observado nas duas concentrações usadas. Quando expostos ao clomazone ocorreu aumento nos níveis de TBARS em músculo em ambas as concentrações, em fígado na maior concentração, enquanto que no cérebro não foram observadas alterações. A proteína carbonil aumentou no fígado dos jundiás após a exposição a ambas as concentrações dos dois herbicidas. Nos jundiás expostos ao glifosato, as atividades das enzimas CAT e SOD não alteraram, enquanto que a GST diminuiu nas concentrações de 0,45 e 0,95 mg/L. Os níveis de ácido ascórbico no fígado não alteraram após a exposição ao herbicida e os níveis de tióis não protéicos reduziram na concentração de 0,95 mg/L. Nos peixes expostos ao clomazone, a atividade da CAT não alterou e a SOD aumentou no fígado na concentração de 0,91 mg/L. A atividade da GST, ácido ascórbico e tióis não protéicos aumentaram no fígado nas concentrações de 0,45 e 0,91 mg/L. No período de recuperação a maioria dos parâmetros alterados foi recuperada para ambos os herbicidas, após oito dias em água sem o herbicida, com exceção da enzima GST e dos níveis de ácido ascórbico após exposição ao clomazone. Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que em curto período de tempo os herbicidas glifosato e clomazone são capazes de induzir estresse oxidativo nos jundiás, sendo essas alterações transitórias e reversíveis.

Palavras-chaves: jundiás; glifosato; clomazone; estresse oxidativo; perfil antioxidante

ABSTRACT

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

OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) EXPOSED TO COMMERCIAL FORMULATIONS OF HERBICIDES GLYPHOSATE AND CLOMAZONE

AUTHOR: CHARLENE CAVALHEIRO DE MENEZES

ADVISOR: VANIA LUCIA LORO

Data and Place of the defense: February, 26th, 2010, Santa Maria

The use of herbicides has increased in agriculture and pisciculture for controlling plant weeds, but the indiscriminate use can cause contamination to organisms such as fish. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects to commercial formulations of glyphosate and clomazone affects oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*). Silver catfish were exposed to: 0 (control), 0.45 or 0.95 mg/L of glyphosate (480 g/L) and 0 (control), 0.45 or 0.91 mg/L of clomazone for eight days and after transferred to water without the herbicide to equal period. The parameters analyzed were lipid peroxidation estimated by a TBARS levels (thiobarbituric acid reactive species), protein carbonyl and the antioxidants activity such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), ascorbic acid and non-protein thiols. The results showed that fish exposed to glyphosate presented increased of TBARS levels in liver and muscle at the higher concentration, whereas in brain this increase was observed in the two concentrations used. When exposed to clomazone caused an enhanced in TBARS levels in muscle at both concentrations, in liver in the higher concentration, while in the brain showed no alterations. The protein carbonyl increased in the liver of silver catfish after exposure to both concentrations of two herbicides. In silver catfish exposed to glyphosate activities of CAT and SOD did not change, while GST reduced at the concentrations of 0.45 and 0.95 mg/L. The ascorbic acid levels in the liver did not change after exposure to the herbicide and the non-protein thiols levels reduced the concentration of 0.95 mg/L. In fish exposed to clomazone the CAT activity did not change and the SOD increased in the liver at the concentration 0.91 mg/L. The GST activity, ascorbic acid and non-protein thiols increased in the liver at the concentrations of 0.45 and 0.91 mg/L. In the recovery period most of the altered parameters recovered to both herbicides, after eight days in water without herbicide, except for the GST enzyme and ascorbic acid levels after exposure to clomazone. The results obtained in this study may suggest that in a short period of time the herbicides glyphosate and clomazone are able of inducing oxidative stress in the silver catfish, being these changes transient and reversible.

KeyWords: silver catfish; glyphosate; clomazone; oxidative stress; antioxidant profile

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Estrutura química do glifosato.....	19
FIGURA 2 – Estrutura química do clomazone.....	20
FIGURA 3 – Exemplar de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	21
FIGURA 4 – Dano oxidativo a macromoléculas biológicas.....	24
FIGURA 5 – Mecanismo antioxidante enzimático.....	27

MANUSCRITO 1

FIGURE 1 – TBARS levels in brain, muscle and liver of <i>Rhamdia quelen</i> after (A) exposure to Roundup® and recovery period (B).....	48
FIGURE 2 – Protein carbonyl levels in liver of <i>Rhamdia quelen</i> after of exposure to Roundup® and recovery period	49

MANUSCRITO 2

FIGURE 1 – Protein carbonyl levels in liver of <i>Rhamdia quelen</i> after of exposure to clomazone and recovery period	70
---	----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

TABLE 1 – Activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the liver of silver catfish exposed to the Roundup® and after recovery period	50
---	----

MANUSCRITO 2

TABLE 1 – Concentration of clomazone herbicide in water samples.....	71
TABLE 2 – TBARS levels in liver, muscle and brain of silver catfish exposed to the herbicide clomazone (8 days) and equal recovery period.....	72
TABLE 3 – Activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the liver of silver catfish exposed to the clomazone and after recovery period	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: ácido aminometilfosfônico

CAT: catalase

CO₂: dióxido de carbono

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTNB: ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico

EROs: espécies reativas de oxigênio

GPx: glutaciona peroxidase

GR: glutaciona redutase

GSH: glutaciona reduzida

GST: glutaciona S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IPA: isopropilamina

LPO: peroxidação lipídica

MDA: malondialdeído

O₂⁻: radical ânion superóxido

⁻OH: radical hidroxila

POEA: polioxietilenoamino

SDS: lauril sulfato de sódio ou duodecil sulfato de sódio

SOD: superóxido dismutase

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
APRESENTAÇÃO.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Herbicidas.....	18
3.1.1 Glifosato.....	18
3.1.2 Clomazone.....	20
3.2 Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	21
3.3 Estresse oxidativo.....	23
3.3.1 Indicadores pró-oxidantes	24
3.3.2 Defesas antioxidantes	25
4 MANUSCRITOS	
4.1 Manuscrito 1: Roundup effects on oxidative stress parameters of <i>Rhamdia quelen</i> and recovery pattern. Charlene Cavalheiro de Menezes, Milene Braga da Fonseca, Vera Maria Morsch, Adriana Santi, Roberta Cattaneo, Cândida Toni, Bárbara Clasen and Vânia Lúcia Loro.....	29
4.2 Manuscrito 2: Oxidative parameters of <i>Rhamdia quelen</i> (TELEOSTEI) in response to herbicide clomazone and recovery pattern. Charlene Cavalheiro de Menezes, Vania Lucia Loro, Milene Braga da Fonseca, Roberta Cattaneo, Alexandra Pretto, Denise dos Santos Miron and Adriana Santi.....	51
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÃO.....	79
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

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 e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra 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 herbicidas são usados para controle de ervas daninhas no ambiente aquático e agrícola, e seu uso tem gerado graves preocupações sobre os potenciais efeitos indesejáveis destes produtos químicos sobre o meio ambiente. Devido à natureza tóxica, podem causar sérios problemas ao ecossistema aquático, exercendo efeitos adversos em muitos organismos como os peixes (ORUÇ *et al.*, 2004; LUSHCHAK *et al.*, 2009).

O herbicida glifosato (sal de isopropilamina (IPA) do ácido N-fosfonometilglicina) é registrado no Brasil para o controle não seletivo de mono e dicotiledôneas em pós-emergência em diversas culturas (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Este herbicida inibe o crescimento das plantas por interferir na produção de aminoácidos aromáticos essenciais pela inibição da enzima enol-piruvil-shiquimato-fosfato sintase – EPSPs – a qual é responsável por uma das etapas de formação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Também inibe a fotossíntese, a síntese dos ácidos nucléicos e estimula a produção de etileno (GIESY *et al.*, 2000; LUSHCHAK *et al.*, 2009). A concentração do glifosato usado nas culturas de arroz e soja no Sul do Brasil varia de 0,36 - 2,16 mg/L, sua meia-vida no solo é de cerca de 30 a 90 dias sendo metabolizado a ácido aminometilfosfônico (AMPA) e dióxido de carbono (CO₂) e possui solubilidade em água de 157 µg/L (GIESY *et al.*, 2000; RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

O clomazone (2-[(2-chlorophenyl)methyl]-4,4-dimethyl-3- isoxazolidinone)) é um herbicida registrado no Brasil para diversas culturas no controle de plantas daninhas em pré-emergência. Este herbicida causa inibição da biossíntese dos compostos isoprenóides, precursores do pigmento fotossintético, determinando redução no nível de caroteno, fitol e, conseqüentemente, de clorofila. Como o caroteno protege a clorofila da luz solar, as plantas emergem brancas por falta de clorofila, morrendo em pouco tempo (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). A concentração usualmente utilizada nas culturas de arroz é de 0,4 - 0,7 mg/L, sua meia-vida no solo é de 28 a 84 dias, variando com o tipo de solo e as circunstâncias ambientais e possui alta solubilidade em água de 1100 mg/L (ZANELLA *et al.*, 2002; RODRIGUES & ALMEIDA, 2005; SENSEMAN, 2007).

No Brasil, não existem muitos estudos abordando toxicidade de herbicidas em peixes, principalmente em espécie nativa como o jundiá (*Rhamdia quelen*). Este peixe possui boa aceitação comercial, adapta-se bem em diferentes ambientes e seu cultivo vem crescendo no sul do Brasil (GOMES *et al.*, 2000). Poluentes ambientais como os herbicidas, podem prejudicar processos fisiológicos e bioquímicos quando assimilados pelos tecidos dos peixes e causar estresse oxidativo levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O equilíbrio entre defesas antioxidantes e a geração de EROs é fundamental para a homeostase do animal. Quando há um desequilíbrio entre pró-oxidantes e defesa antioxidante uma situação de estresse oxidativo ocorre levando a uma produção excessiva de EROs que pode ocasionar danos aos lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (AHMAD *et al.*, 2000; MARAN *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010).

As espécies reativas de oxigênio tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$) podem reagir com macromoléculas biológicas e produzir a peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e oxidação de proteínas, resultando no estresse oxidativo (MONTEIRO *et al.*, 2006). Apesar do perigo das EROs, as células possuem mecanismos de defesa para neutralizar os efeitos prejudiciais dos radicais livres. O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) e o sistema antioxidante não enzimático é representado pelos níveis de ácido ascórbico, tióis não protéicos e glutaciona reduzida (GSH) (AHMAD *et al.* 2000; ORUÇ *et al.*, 2004). A SOD é a primeira enzima na linha de defesa, é responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é degradado em água e oxigênio molecular via catalase. A GPx metaboliza uma variedade de peróxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio. Glutaciona S-transferase (GST) age em processos de biotransformação e destoxificação de xenobióticos (MARAN *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010). Da mesma forma, o sistema de defesa antioxidante não-enzimático atua impedindo reações de auto-oxidação e tem sido vinculado com a redução de radicais livres (SAYEED *et al.*, 2003). Dentre estes, destaca-se a glutaciona reduzida (GSH), o mais abundante tiol não-protéico e um dos principais agentes redutores encontrados nas células e atua como co-fator para a GST e GPx (MONTEIRO *et al.*, 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010).

Os efeitos dos herbicidas sobre os peixes variam de acordo com a espécie, estágio de crescimento, com o produto (formulação utilizada), concentração do produto, tempo de exposição (CRESTANI *et al.*, 2007; GLUSCZAK *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008; CATTANEO *et al.*, 2008; MIRON *et al.*, 2008). Então, a partir do comportamento dos herbicidas e a possibilidade de contaminação da água, tornou-se interessante analisar seus possíveis efeitos tóxicos em peixes de interesse comercial como os jundiás. Pretendeu-se verificar se a exposição aos herbicidas glifosato e clomazone, em condições de laboratório, alteram parâmetros de estresse oxidativo destes organismos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi verificar se a exposição a formulações comerciais dos herbicidas glifosato e clomazone altera parâmetros de estresse oxidativo em diferentes tecidos de jundiás (*Rhamdia quelen*) e se estes parâmetros são recuperados quando os peixes são colocados em água sem o herbicida.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o perfil oxidativo através da medida dos níveis de peroxidação lipídica pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos hepático, muscular e cerebral e a carbonilação de proteínas em fígado dos jundiás expostos ao glifosato e clomazone;
- ✓ Avaliar a resposta antioxidante enzimática através da determinação da atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em fígado de jundiás expostos aos herbicidas glifosato e clomazone;
- ✓ Determinar a atividade da glutathione S-transferase (GST) em fígado de jundiás expostos ao glifosato e clomazone;
- ✓ Determinar o conteúdo dos antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico e tióis não-protéico em fígado de jundiás expostos aos herbicidas;
- ✓ Verificar se as alterações observadas persistem após igual período de recuperação em água sem os herbicidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Herbicidas

Os herbicidas são utilizados ativamente em ecossistemas terrestres e aquáticos para o controle de ervas daninhas e seu uso tem gerado graves preocupações sobre potenciais efeitos adversos destes produtos sobre o meio ambiente e a saúde humana (LUSHCHAK *et al.*, 2009).

O uso intensivo e inadequado desses produtos químicos pode causar contaminação da água, pois são usados no solo ou próximo deles e isto pode afetar organismos, particularmente os peixes (ORUÇ *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008).

3.1.1 Herbicida Glifosato

O uso do glifosato (N-(fosfonometil) glicina) como herbicida foi proposto por cientistas da Companhia Monsanto em 1970 e a formulação comercial foi primeiramente introduzida em 1974 (GIESY *et al.*, 2000; LUSHCHAK *et al.*, 2009). Atualmente, existem inúmeras formulações de herbicidas baseadas em glifosato, todas contendo os mesmos ingredientes básicos como o sal de isopropilamina (IPA) do ácido N-fosfonometilglicina, um surfactante e a água.

Normalmente a concentração de glifosato dessas formulações é o ácido equivalente 360 ou 480 g/L. Porém, certas formulações possuem uma base diluída com água a fim de obter produtos mais homogêneos. A toxicidade aguda deste herbicida é considerada baixa, pertencendo à classe toxicológica IV (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Para registrar um produto nos Estados Unidos são realizados em torno de 20 testes, mas somente sete são feitos para os ingredientes inertes (curto período), o restante é feito apenas com o ingrediente ativo (longa duração) (COX & SURGAN, 2006).

Um único produto químico pode ter vários ingredientes inertes. Estes atuam como solventes, surfactantes, conservantes e também possuem outras funções. A utilização de ingredientes inertes pode aumentar a persistência do herbicida no ambiente, podendo afetar o comportamento dos ingredientes ativos e em algumas vezes a sua volatilização (COX & SURGAN, 2006).

As diferentes formulações do herbicida glifosato são utilizadas em lavouras de arroz e soja no sul do Brasil. É um herbicida de amplo-espectro, não-seletivo, pós-emergente, utilizado para o controle de ervas daninhas e gramíneas indesejáveis (LANGIANO & MARTINEZ, 2008; RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). O glifosato (Figura 1) pertence ao grupo químico das glicinas. Possui solubilidade em água de 157 µg/L a 25°C e meia vida no solo de 30 a 90 dias, dependendo do tipo de solo e do nível de matéria orgânica, sendo metabolizado a ácido aminometilfosfônico (AMPA) e CO₂ (GIESY *et al.*, 2000; JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002). A concentração de glifosato usado em culturas de arroz e soja no sul do Brasil é em torno de 0,36 – 2,16 mg/L (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

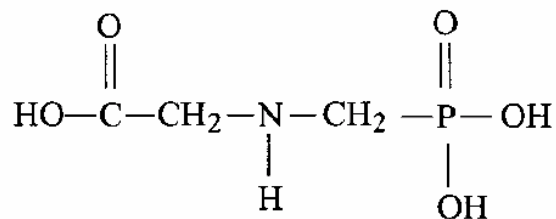


Figura 1 - Estrutura do composto glifosato (ácido N-fosfonometilglicina) (adaptado de RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

De acordo com Jiraungkoorskul *et al.* (2002), a formulação do Roundup® é composta principalmente pelo sal de isopropilamina de glifosato 480 g/L, água e o surfactante polioxietilenoamino (POEA). O POEA é uma substância não-iônica usada na formulação do herbicida para aumentar a eficácia do ingrediente ativo glifosato e promover a penetração na cutícula da planta. Este surfactante parece ser mais tóxico na formulação do Roundup® que o glifosato, pois potencializa sua ação e chega a ser até três vezes mais tóxico que o glifosato. A grande toxicidade aquática do Roundup®, comparada ao seu ingrediente ativo glifosato, pode ser atribuída ao POEA (GIESY *et al.*, 2000).

Esse herbicida inibe o crescimento da planta através da interferência com a produção de aminoácidos aromáticos essenciais pela inibição da enzima enol-piruvil-shiquimato-fosfato sintase (EPSPs). A EPSPs é responsável por umas das etapas da síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Isto faz com que ocorra a elevação dos níveis de amônia fitotóxica, assim como de glutamina e glutamato. Também inibe a fotossíntese, a síntese de ácidos nucléicos e estimula a produção de etileno, provocando o amarelecimento progressivo das folhas, murchamento, necrose e posterior morte das plantas, o que demora em média de 4-20 dias (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005; LUSHCHAK *et al.*, 2009).

Os peixes e os invertebrados aquáticos são os mais sensíveis a este herbicida e aos outros componentes de seus produtos comerciais. Recentes estudos têm mostrado efeitos adversos potenciais do Roundup® e seus componentes sobre os peixes. Por exemplo, o Roundup® pode afetar o metabolismo energético, formação de radicais livres e atividade da acetilcolinesterase (GLUSCZAK *et al.*, 2006; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; LUSHCHAK *et al.*, 2009).

3.1.2 Herbicida Clomazone

O herbicida clomazone 2-[(2-clorofenil)metil]-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona (Figura 2) é amplamente utilizado para o controle de espécies infestantes de folha larga e gramíneas. É usado para o controle de plantas daninhas em pré-emergência na cultura de soja, algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho, hortaliças (ZANELLA *et al.*, 2000; RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

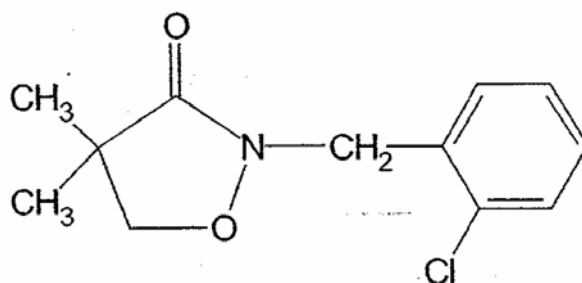


Figura 2: Estrutura química do herbicida clomazone (adaptado de Senseman, 2007).

A toxicidade aguda do clomazone é considerada alta, pertencendo à classe toxicológica II (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Pertence ao grupo químico das

isoxazolidinonas, é absorvido pelas raízes e move-se no xilema até as folhas das plantas (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Este composto é encontrado na forma comercial de concentrado emulsionável 36 ou 50% (Gamit[®], Command 4EC[®]). O herbicida clomazone usado em nosso estudo foi obtido de FMC Corporation (Gamit[®], 50% pureza, Philadelphia, EUA).

Este herbicida causa inibição da biossíntese dos compostos isoprenóides, precursores do pigmento fotossintético, determinando redução no nível de caroteno, fitol e, conseqüentemente, de clorofila. Como o caroteno protege a clorofila da luz solar, as plantas mais suscetíveis apresentam albinismo como o principal sintoma, causando aparência descorada (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

É altamente efetivo, mas causa grande contaminação, pois possui solubilidade em água de 1100 mg/L a 25°C, sua meia-vida no solo é de 28 a 84 dias, mas esse período pode variar com o tipo do solo e as circunstâncias ambientais (ZANELLA *et al.*, 2002; SENSEMAN, 2007). A concentração usualmente utilizada nas culturas de arroz é de 0,4 - 0,7 mg/L (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

3.2 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá, *Rhamdia quelen* (Figura 3) tem distribuição neotropical sendo encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México, no Brasil está presente na região da Depressão Central do Rio Grande do Sul (GUEDES, 1980).



Figura 3: Exemplar de jundiá *Rhamdia quelen*

Jundiá é o nome comum dado aos peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia quelen*, cuja classificação é confusa desde que foi escrita (GOMES *et al.*, 2000). SILFVERGRIP (1996) realizou uma ampla revisão taxonômica do gênero, baseada em caracteres da morfologia interna e concluiu que o gênero *Rhamdia* (classe: Osteichthyes, série: Teleostei, ordem: Siluriformes, família: Pimelodidae) é formado por apenas 11 espécies dentro das 100 anteriormente descritas. Há certo consenso entre os especialistas da ordem Siluriformes que a família Pimelodidae deve ser dividida em Pimelodidae, Heptapteridae e Pseudopimelodidae. O gênero ficaria então na família Heptapteridae. Outros nomes vulgares para o jundiá no Brasil é jundiá-tinga, mandi e sapipoca (GOMES *et al.*, 2000; BALDISSEROTTO & NETO, 2004).

É um peixe de água doce, omnívoro com tendência piscívora preferindo crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. Apresenta barbilhões localizados junto à boca, que provavelmente possuem receptores de gosto para ajudar na localização do alimento e na percepção da água (GOMES *et al.*, 2000; BALDISSEROTTO & NETO, 2004). Possui hábito noturno e vive em lagos e poços fundos dos rios, preferindo ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação (GOMES *et al.*, 2000; PERDICES *et al.*, 2002).

É uma espécie que pode suportar o frio do inverno e crescer rápido no verão. Quando cultivado a uma densidade de 2 a 4 peixes/m² pode alcançar 600-800g de peso corporal em oito meses (BARCELLOS *et al.*, 2003). Pelo fato dos alevinos serem aclimatados a 31°C e suportarem temperaturas de 15 a 34°C, podem ser considerados euritérmicos. O crescimento do jundiá aumenta com a elevação da temperatura, logo nos primeiros anos de vida. Os machos possuem taxa de crescimento maior que as fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, porém após esse período a situação se inverte. As fêmeas podem atingir comprimento de 66,5 cm e os machos de 52 cm. A maturidade sexual é atingida em torno de um ano de vida em ambos os sexos. As fêmeas apresentam maior tempo de vida, cerca de 21 anos, enquanto os machos podem teoricamente chegar a 11 anos (GOMES *et al.*, 2000).

A coloração do *Rhamdia quelen* varia de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia. Ele pode variar a coloração do corpo de acordo com o ambiente que se encontra, pois quando colocados em ambientes claros, o jundiá tende a ficar mais claro e o inverso ocorre quando este peixe se encontra em ambiente escuro. Um

melhoramento genético deste peixe produziu o chamado jundiá-cinza, o qual, segundo alguns criadores, teriam melhor rendimento para a piscicultura (GOMES *et al.*, 2000; BALDISSEROTTO & NETO, 2004).

Esta espécie tem despertado grande interesse no sul do Brasil devido, suas características como resistência ao manejo, crescimento rápido, mesmo nos meses de inverno, boa eficiência alimentar, carne saborosa e sem espinhos intramusculares, (BOCHI *et al.*, 2008; JUNIOR *et al.*, 2008). Além disso, o jundiá é um peixe que apresenta excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para a pesca quanto para a alimentação, sendo uma espécie com excelentes características para o processamento (BARCELLOS *et al.*, 2001; BARCELLOS *et al.*, 2003).

3.3 Estresse oxidativo

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 herbicidas, podem provocar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em organismos aquáticos como os peixes, ocasionando assim, uma situação de estresse oxidativo (AHMAD *et al.*, 2000; ÜNER *et al.*, 2005; ORUÇ, 2009).

O estresse oxidativo ocorre em situações em que há um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes levando a uma produção excessiva de EROs (AHMAD *et al.*, 2000; MARAN *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010). Muitos xenobióticos, tais como os herbicidas, podem produzir EROs via vários mecanismos, como interferência no transporte de elétrons na membrana mitocondrial e, subsequente, acumulação de intermediários reativos, inativação de antioxidantes enzimáticos, diminuição de antioxidantes não-enzimáticos e peroxidação lipídica (MODESTO & MARTINEZ, 2010).

As espécies reativas de oxigênio, tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$) podem reagir com macromoléculas biológicas e produzir a peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e

oxidação de proteínas (Figura 4), resultando no estresse oxidativo (BARATA *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2006).

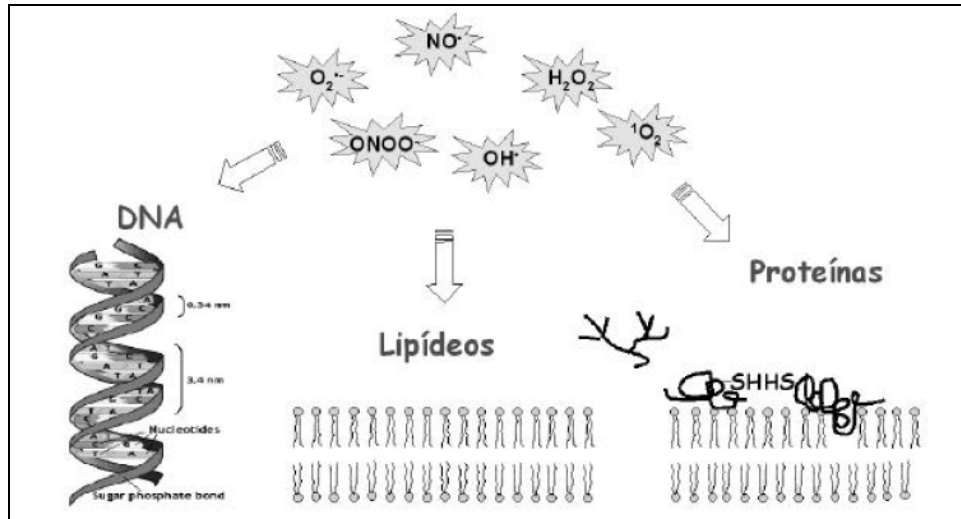


Figura 4 - Dano oxidativo a macromoléculas biológicas (adaptado de Torres, 2003).

3.3.1 Indicadores pró-oxidantes

O dano aos lipídios induz o fenômeno conhecido como peroxidação lipídica (LPO). É o resultado da atuação de radicais livres sobre as membranas biológicas, que são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (ORUÇ & USTA, 2007). A LPO causada por herbicidas tem sido considerada como um indicador de valor em danos oxidativos de componentes celulares (ORUÇ, 2009).

Um dos mais conhecidos produtos da LPO é o malondialdeído (MDA), o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados e é ensaiado com o ácido tiobarbitúrico e expresso em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006; OROPESA *et al.*, 2009). Altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da LPO (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006). A peroxidação lipídica pode ocorrer como consequência do desequilíbrio entre o sistema antioxidante e o estado pró-oxidante gerado pela toxicidade de herbicidas (BALLESTEROS *et al.*, 2009).

As EROs podem também causar prejuízo às proteínas (SIES *et al.*, 1993). O dano à estrutura protéica pode ocasionar em clivagens das ligações peptídicas,

modificações nos resíduos dos aminoácidos, reações de peptídeos com lipídios e com os produtos da oxidação dos carboidratos, oxidações dos grupos sulfidrila, formação de proteína carbonil, entre outras (STADTMAN, 2004; LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006). Muitos fatores podem causar o aumento nos níveis de proteínas oxidadas como aumento no número de espécies oxidantes, decréscimo nos “scavengers” dessas espécies, aumento na susceptibilidade das proteínas a oxidação ou um decréscimo na remoção das espécies oxidadas (DAVIES, 2000). Alguns autores sugerem que a dosagem de proteína carbonil em peixes pode ser usada como biomarcador complementar de estresse oxidativo (ALMROTH *et al.*, 2005; PARVEZ & RAISUDDIN, 2005).

3.3.2 Defesas Antioxidantes

Apesar do potencial perigo das EROs, as células apresentam uma variedade de mecanismos de defesa para neutralizar os efeitos prejudiciais dos radicais livres (MONTEIRO *et al.*, 2006). O sistema de defesa antioxidante (Figura 5) tem sido muito estudado, pois protege os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Também devido a sua utilidade em determinar biomarcadores que podem ser usados nos sistemas de monitoramento ambiental (MARAN *et al.*, 2009). As defesas antioxidantes englobam compostos de natureza enzimática e não-enzimática (BALLESTEROS *et al.*, 2009).

Os antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos são essenciais para a conversão das EROs em metabólitos não prejudiciais a célula, bem como para proteger e restaurar o metabolismo e as funções celulares. As principais enzimas para destoxificação das EROs nos organismos são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona redutase (GR) e a glutatona peroxidase (GPx) (MONTEIRO *et al.*, 2006; BALLESTEROS *et al.*, 2009). Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades de radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio (MONTEIRO *et al.*, 2006). A atividade das enzimas antioxidantes pode ser aumentada ou inibida dependendo da intensidade e duração do estresse aplicado, bem como da suscetibilidade das espécies expostas (BALLESTEROS *et al.*, 2009).

A função da SOD foi descoberta em 1969 por McCord & Fridovich. Esta enzima está presente em todos os organismos aeróbicos e catalisa a dismutação do radical superóxido. Existem três classes de superóxido dismutase: Fe-SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD. A CuZn-SOD e a Mn-SOD, encontram-se em eucariotos na forma citosólica e mitocondrial, respectivamente e a Fe-SOD, apenas em procariotos. A SOD catalisa a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . O H_2O_2 , que por sua vez é degradado pela ação da CAT ou GPx, resultando em água e O_2 (MCCORD & FRIDOVICH, 1969; MONTEIRO *et al.*, 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010).

A CAT é uma enzima tetramérica, consistindo de quatro subunidades idênticas de 60 KDa, que contém um único grupo ferroprotoporfirina por unidade e tem uma massa molecular de aproximadamente 240 KDa. É uma enzima localizada nos peroxissomas e reage eficientemente com o H_2O_2 para formar H_2O e O_2 (MATÉS, 2000; BALLESTEROS *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, as defesas antioxidantes não-enzimáticas desempenham papel de fundamental importância para a célula. Nesse grupo destacamos o papel dos tióis não-protéicos e da vitamina C (PARVEZ & RAISUDDIN, 2006).

Os tióis não-protéicos têm uma importante função na defesa contra as EROs (MASSELA *et al.*, 2005; PARVEZ & RAISUDDIN, 2006). A glutathiona reduzida (GSH) é o tiol não-protéico mais abundante presente nas células animais (OROPESA *et al.*, 2009). É formada por cisteína, glicina e resíduos de ácido glutâmico e sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento-SH, presente na cisteína (ARTEEL & SIES, 2001). Age como principal antioxidante não-enzimático nas células e está envolvida em numerosos processos que são essenciais para as funções biológicas normais, como a síntese de DNA e proteínas. Desse modo, a oxidação ou depleção da GSH pode diminuir a síntese protéica. A GSH também protege as células de substâncias tóxicas através da conjugação de metabólitos, incluindo xenobióticos e produtos da peroxidação lipídica, resultando em um intermediário menos tóxico e assim, reduzindo as injúrias nas células (MARAN *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010). A conjugação da GSH com estes metabólitos é catalisada pela glutathiona S-transferase (GST). Esta enzima participa da defesa contra o estresse oxidativo, pois é capaz de destoxificar compostos prejudiciais como, por exemplo, os herbicidas. Dessa forma, sua principal função é a defesa contra os danos oxidativos. Assim, o aumento desta enzima é considerado

benéfico para combater o estresse ambiental (BALLESTEROS *et al.*, 2009). A GST facilita o ataque dos pesticidas pela GSH e remove o composto que pode levar a efeitos tóxicos (MARAN *et al.*, 2009).

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é um importante metabólito celular com várias funções descritas, que desempenha papel de fundamental importância na destoxificação das EROs, funcionando como antioxidante (PARVEZ & RAISUDDIN, 2006). A vitamina C é um nutriente hidrossolúvel indispensável para manter os processos fisiológicos de certos animais, incluindo a maioria dos peixes (WANG *et al.*, 2003). Age diretamente sobre as EROs e está envolvida na regeneração de α -tocoferil em α -tocoferol (Vitamina E) (CHAN, 1993). A vitamina C interage com as EROs antes que possam agir oxidativamente sobre lipídios e proteínas (NORDBERG & ARNER, 2001).

Dados disponíveis sobre experimentos em animais e estudos *in vitro* indicam que os herbicidas que induzem alterações na atividade de enzimas podem modificar a capacidade de defesa antioxidante dos sujeitos expostos e assim, afetar a suscetibilidade ao estresse oxidativo (MARAN *et al.*, 2009).

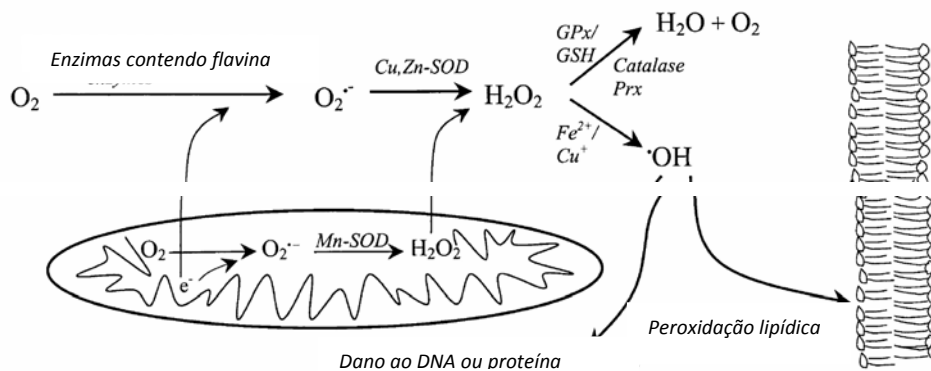


Figura 5 - Enzimas antioxidantes (adaptado de Nordberg & Arnér, 2001).

4 RESULTADOS

Os resultados inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscritos científicos, os quais se encontram aqui estruturados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos. Os manuscritos estão dispostos da mesma maneira que foram submetidos.

4.1 Manuscrito 1

Roundup[®] effects on oxidative stress parameters of *Rhamdia quelen* and recovery pattern

Charlene Cavalheiro de Menezes^a, Milene Braga da Fonseca^a, Vera Maria Morsch^b, Adriana Santi^a, Roberta Cattaneo^a, Cândida Toni^a, Bárbara Clasen^a and Vânia Lúcia Loro^{b*}

Submetido para a revista Pesticide Biochemistry and Physiology

Roundup® effects on oxidative stress parameters of *Rhamdia quelen* and recovery pattern

Charlene Cavalheiro de Menezes^a, Milene Braga da Fonseca^a, Vera Maria Morsch^b, Adriana Santi^a, Roberta Cattaneo^a, Cândida Toni^a, Bárbara Clasen^a and Vânia Lúcia Loro^{b*}

^a Programa de Pós – Graduação em Bioquímica Toxicológica

^b Laboratório de Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding Author:

(*) Dr. Vânia Lucia Loro.

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55 –3220-9456

Fax: 55 (55) 3220-8240

E-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

Antioxidant enzymes and oxidative stress indicators were evaluated in fish exposed to glyphosate (Roundup® 48%): control, 0.45 or 0.95 mg/L. After exposure, fish were transferred to clean water to recovery response. Herbicide increased TBARS (thiobarbituric acid reactive species) in liver and muscle at higher concentration and in brain at all periods of exposure. Protein carbonyls in liver increased after exposure. Catalase and superoxide dismutase activities in liver did not change in fish exposed to both concentrations and glutathione S-transferase levels decrease in both concentrations. The levels of ascorbic acid in liver did not change after exposure and non-protein thiol levels reduced at concentration of 0.95 mg/L. In the recovery period, the most of the parameters altered were recovered. We suggest that oxidative stress occurred during exposure period due to increase in lipid peroxidation and protein carbonylation. The sum of results concerning oxidative and antioxidant profile indicate that short time exposure to herbicide is capable to cause oxidative stress in fish tissues.

Keywords: *Rhamdia quelen*, oxidative stress, Roundup® 48%, toxicological parameters

1.Introduction

The development of industrial and agricultural activities is the main factor leading to the increasing of contaminants in aquatic ecosystems. The sources of contaminants are numerous and include herbicides, which cause alterations in biochemical parameters of aquatic organisms [1]. The Roundup® is an herbicide non-selective and has been used to controlling aquatic weeds [2, 3]. The commercial formulation Roundup® is composed by isopropylamine (IPA) salt and a surfactant, polyoxyethylene amine (POEA). The toxicity of this herbicide can be attributed to the surfactant added to enhance their efficacy [4]. Roundup® formulation rapidly dissipates from surface waters and soil microflora biodegrade it into AMPA (aminomethylphosphonic acid) and CO₂ (carbon dioxide). The concentrations used in rice and soybean cultures in Southern Brazil range from 0.36 to 2.16 mg/L [5]. This herbicide does not bioaccumulate in terrestrial or aquatic animals and is widely used in the world due to its high efficiency, it is practically nontoxic and readily degradable in the environment. It is used in agriculture to control annual and perennial plants, grasses and broad-leaved woody species [6].

Silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) was chosen by the fact of being a commercially relevant species for fisheries in the southern region of Brazil, it has good productivity and it is acceptable on the consumer market. The silver catfish survives in cold winters and grows rapidly in summer, reaching a body weight of 600–800 g in 8 months [7].

The use of biomarkers to investigate the effects of specific chemicals has increased and most studies have been conducted under laboratory conditions. Various biological molecules and enzyme activities indicate the exposure of organism to pollutants and/or magnitude of response of an organism to pollutant [8]. The reactive oxygen species (ROS) production can exert adverse effects in aquatic organisms. Majority of the environmental pollutants are capable of inducing oxidative stress in aquatic animals including fish [9, 10]. Oxidative stress in fish also is represented by damage in biological systems or a failure in antioxidant defense system. The hydroxyl radical (OH[•]), that also is a product of reactions with free radicals react quickly with near molecules leading to oxidative changes in proteins, lipids and nucleic acids [11]. Lipid peroxidation (LPO) and carbonylation of proteins has been used to assess the effect of pollutants in aquatic organisms. Enzymatic and

non-enzymatic antioxidants are essential to maintain the redox status of fish cells and serve as an important defense against oxidative stress [8, 12]. In fish, enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) are the major enzymatic antioxidant systems, while ascorbic acid and non-protein thiols belong non-enzymatic antioxidant systems [8, 12, 13]. Another important enzyme that acts in xenobiotic detoxification is the glutathione S-transferase (GST).

The purpose of this study was to evaluate if a commercial formulation containing glyphosate at environmental relevant concentrations affect some aspects of oxidative stress and enzymatic and non-enzymatic antioxidant system in silver catfish *Rhamdia quelen*. Also, in order to better understand the consequences of intoxication fish were submitted to an equal recovery period in herbicide-free water.

2. Materials and Methods

2.1 Fish

Juvenile silver catfish of both sexes with an average weight of 20.0 ± 1.0 g and measuring 11.0 ± 1.0 cm length were obtained from a fish farm (RS, Brazil). Fish were acclimated to laboratory conditions for 10 days, in tanks (250 L) prior to the experiments. They were kept in continuously aerated water with a static system and with a natural photoperiod (12h light/12h dark). During acclimation and all experimental period the average of water parameters were: temperature $24.5 \pm 2.0^\circ\text{C}$, pH 6.5 ± 0.2 units, dissolved oxygen 6.21 ± 2.0 mg/L, non ionized ammonia 0.8 ± 0.01 $\mu\text{g/L}$, nitrite 0.06 ± 0.01 mg/L. Fish were fed once a day. Sewage and pellet leavings were removed every other day by suction.

2.2 Chemicals

The herbicide used in this study (Roundup® (48% acid equivalent Company Monsanto, St Louis MO)) was dissolved in water. Bovine serum albumin, Triton X-100, hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA), sodium dodecyl sulfate (SDS), 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 2,4-

dinitrophenylhydrazine (DNPH) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3 Experimental design

The Roundup® concentration usually recommended in rice fields is of 0.36 to 2.16 mg/L, thus initial measured concentrations of 0.45 and 0.95 mg/L were chosen for our experiments. After the acclimation period, the fish were distributed in control group and exposed group (0.45 and 0.95 mg/L), in 250 L boxes in number the eight fish per box in duplicate, (n=16). The stock solution (100 mg/L) was diluted to obtain solutions in the experimental concentrations (0.45 and 0.95 mg/L) and then added to the experimental boxes. The stock solution was added only in the beginning of the experiment. Fish were exposed for eight days to glyphosate (Roundup® 48% acid equivalent). During the experimental period were not observed behavioral changes in the fish. After the exposure, half the fish of each box (4) were sampled and tissues were collected. The fish were killed by punching the spinal cord behind the opercula. Brain, white muscle and liver samples were quickly removed, washed with 150 mM saline solution, packed in Teflon tubes and kept at -20°C for posteriors analyses. The remaining fish transferred for boxes contends water without herbicide for eight day for recovery periods. The water in the boxes was not renewed to maintain the concentration of Roundup® during the period of exposure. The filter systems were used to maintain water quality. Water quality parameters during the experimental period were maintained equal those of the acclimation period. During all experimental period (exposure and recovery) the fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). The investigation was authorized by the board on experimentation on Animals of the Federal University of Santa Maria, reference number: 23081.010372/2008-58.

2.4. Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was estimated by a TBARS assay, performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which was optically measured. In liver, muscle and brain homogenates (100-400 µL) were added TCA 10% and 0.67% thiobarbituric acid, totaling 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 nmol MDA/mg protein according to Buege & Aust [14].

2.5 Protein Carbonyl assay

The liver tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 using a glass homogenizer. Protein carbonyl content was assayed by the method described by Yan et al. [15] 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 for 15 min. Then, the protein isolated from the interface was washed twice by resuspension in ethanol/ethyl acetate (1:1), and suspended in 1.0 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 2N HCl without DNPH was included for each sample. The total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22.000 M/cm. The protein carbonyl contents was expressed as nmol carbonyl/mg protein.

2.6 Antioxidant enzymes

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry [16]. Liver tissue were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 (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 (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 spectrophotometry at 240 nm. Catalase activity was calculated in terms of pmol/min using equation adjusted to data, and after expressed in µmol/min/mg protein. SOD activity was performed in liver tissue and is based on inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by Cord & Fridovich [17]. In this method, SOD present in the sample

competes with the detection system for radical superoxide. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50% the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH10) and adrenalin (1 mM). GST activity was measured according to Habig et al. [18] 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 molar extinction coefficient used for CDNB was $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The activity was expressed as $\mu\text{mol GS-DNB}/\text{min}/\text{mg protein}$.

2.7 Non-enzymatic antioxidants

Ascorbic acid and non-protein thiols were studied as non-enzymatic antioxidants. Ascorbic acid content was determined by the method of Roe [19], modified by Jacques-Silva et al. [20]. Tissue (150 mg) was homogenized with 1.5 mL Tris HCl 50 mM (pH 7.5) followed by centrifugation. An aliquot of the supernatants (1.0 mL) mixed with 1.0 mL trichloroacetic acid 10% followed by centrifugation. An aliquot of the supernatants (300 μL) was used for determination with 2,4-dinitrophenylhydrazine (4.5 mg/mL), 0.6 mg/mL thiourea, CuSO_4 (0.075 mg/mL) and trichloroacetic acid 13.3% and incubated for 3 h at 37°C. Then H_2SO_4 65% (v/v) was added to the medium. The ascorbic acid levels were expressed as $\mu\text{mol ASA}/\text{g}$ of liver.

Non-protein thiols levels were determined in liver by the method of Boyne and Ellman [21]. Tissue (150 mg) was homogenized with 1.5 mL Tris HCl 50 mM (pH 7.5) followed by centrifugation at $3.000 \times g$ for 10 min. An aliquot of the supernatants (1.0 mL) mixed with 1.0 mL trichloroacetic acid 10% followed by centrifugation. An aliquot of the supernatants (400 μL) was used for determination with 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 10 mM (DTNB), Phosphate buffer 0.5 mM (pH 6.8), cysteine 0.5 mM and the reaction was followed at 412 nm. The non-protein thiols levels were expressed as $\mu\text{mol SH}/\text{g}$ of liver.

2.8 Protein determination

Protein was determined by the Comassie blue method using bovine serum albumin as standard. Absorbance of samples was measured at 595 nm [22].

2.9 Statistical procedures

Statistical analyses were performed using two-way analyses of variance (ANOVA) to determinate concentration and time effects. Means were compared by Tukey test and expressed as mean \pm standard deviation (n=8). Differences were considered to be significant between groups at a significance level of ($P < 0.05$).

3. Results

Fish exposed to a commercial formulation containing glyphosate (Roundup® 48%) showed increased TBARS levels in liver a proportion of 43% at the concentration of 0.95 mg/L ($P < 0.05$). No significant changes were recorded at the concentration of 0.45 mg/L (Figure 1A). TBARS levels were increased in the brain at the concentration of 0.45 mg/L (25%) and 0.95 mg/L (22%) of herbicide in relation to the control group ($P < 0.05$) (Figure 1A). TBARS levels were not altered in muscle of fish exposed to herbicide at the concentration of 0.45 mg/L. In contrast, muscle exposed to 0.95 mg/L showed increase (46%) in TBARS levels when compared with control values ($P < 0.05$) (Figure 1A). A recovery in TBARS levels was observed where values returned to the control in the three tissues examined after eight days in herbicide-free water (Figure 1B). Liver TBARS showed a significant difference between the exposure and recovery period only at the highest concentration studied. There was a decrease in liver of 71% in the levels of TBARS at the concentration of 0.95 mg/L in relation to same concentration in the exposure period ($P < 0.05$) (Figure 1A and 1B). In the brain there was a decrease in both concentrations tested in recovery period as compared with the exposure period. A decrease rate was in the proportion of 26% in 0.45 and 22% in 0.95 mg/L ($P < 0.05$) (Figure 1A and 1B). Comparing muscle TBARS levels in the exposure and recovery periods we observed a reduction of 29% at the concentration of 0.95 mg/L ($P < 0.05$) (Figure 1A and 1B).

A significant increase of protein carbonyls in the liver was observed after exposure period at both concentrations tested. We recorded increase of 52% and 43% at the concentrations of 0.45 mg/L and 0.95 mg/L, respectively ($P<0.05$) (Figure 2). Protein carbonyl returned to values next to control in recovery period (Figure 2). In the recovery period, the concentration of 0.45 mg/L showed a decrease of 25% in protein carbonyl levels as compared with exposure period ($P<0.05$) (Figure 2). For concentration of 0.95 mg/L there was a reduction of 26% of this parameter in relation to exposure period ($P<0.05$) (Figure 2).

Our study showed that silver catfish exposed to both concentrations of the herbicide did not show alterations in CAT activity in relation with control group (Table 1). On the contrary, there was a significant decrease of CAT activity at both concentrations tested in the recovery period compared with the control group ($P<0.05$) (Table 1). Comparing exposure and recovery periods, the recovery group of 0.45 mg/L showed a decrease of 54% in the CAT activity when compared to the value observed in the exposure group (Table 1) ($P<0.05$). The concentration of 0.95 mg/L showed a reduction of 61% in the CAT activity ($P<0.05$) (Table 1). No alterations were recorded for SOD activity in the liver during exposure period both concentrations, when compared with control group (Table 1). After recovery period there was a significant decrease of SOD activity (69%) at the concentration of 0.95 mg/L compared to control group ($P<0.05$) (Table 1). Comparing the exposure with recovery periods significant decrease of SOD was observed (49%) at the concentration of 0.95 mg/L ($P<0.05$) (Table 1).

The present study showed that herbicide exposure reduced GST activity. The recorded reduction was 42% at the concentration of 0.45 mg/L and 41% for 0.95 mg/L when compared to control group ($P<0.05$) (Table 1). On the contrary, in recovery period a different result was obtained, where an increase of GST activity was observed to both herbicide concentrations tested ($P<0.05$) (Table 1). Comparing the periods of exposure and recovery we observed that there was a significant GST increase at the concentration of 0.45 (158%) and 0.95 (223 %) mg/L in recovery period ($P<0.05$) (Table 1).

In relation to non-enzymatic antioxidants, the levels of ascorbic acid did not change during exposure and recovery periods at both herbicide concentrations tested (Table 1). However, comparing exposure and recovery periods there was a significant decrease in ascorbic acid levels in the recovery period that corresponding

to 15% and 16% at the concentrations of 0.45 e 0.95 mg/L, respectively ($P<0.05$) (Table 1).

The levels of non-protein thiols reduced significantly at the concentration of 0.95 mg/L in exposure period and returned to control values after eight days in herbicide-free water ($P<0.05$) (Table 1). Comparing periods of exposure and recovery a significant increase of 20% at the concentration of 0.45 mg/L and 25% at the concentration of 0.95 mg/L was observed in recovery period ($P<0.05$) (Table 1).

4. Discussion

Lipid peroxidation (LPO) has often been used as an effective biomarker of toxic pollutants in fish [23, 24, 25]. The results obtained showed increased TBARS levels in liver and muscle at the concentration of 0.95 mg/L and in brain to both concentrations tested. TBARS increase in tissues of *Rhamdia quelen* is a clear indicative of lipid peroxidation induced by commercial formulation Roundup® herbicide. The results obtained in our study, shows similarity with the results obtained by Crestani et al. [24] that observed TBARS increase in brain and liver of *R. quelen* exposed to clomazone herbicide. Pesticide frequently induce oxidative stress in fish tissues as showed by Oruç et al. [26] in brain and kidney of *Oreochromis niloticus* exposed to 2,4-D. Pesticides like Roundup® may induce oxidative stress leading to the generation of free radicals and cause lipid peroxidation as a mechanism involved in pesticide toxicity. Elevation of lipid peroxidation in tissues suggests that Roundup® mediated free radical production can be the cause of oxidative stress. However, the alterations observed in fish tissues concerning lipid peroxidation seem to be transient because when the fish were transferred to herbicide-free water, TBARS levels returned to control values. Similar TBARS results of recovery pattern was also showed by Crestani et al. [24] that observed liver TBARS recovery in clean water after clomazone exposure by 96 and 192 h.

Protein carbonyl formation can occur as result of oxidative stress and has been show to play an important role in a variety of pathological conditions [10]. We observed a significant increase in levels of protein carbonyl in fish liver after the exposure when compared to the control values. The induction of protein carbonyl in fish was identified as a potentially useful biomarker of oxidative stress that warrants its application in the field investigations [27]. Our results is in agreement with Miron et

al. [28] observed an increase in protein carbonyl in the liver of *Leporinus obtusidens* exposed to the herbicide clomazone in concentration of 0.5 mg/L after 96 and 192 h and this increase persisted after the recovery period of 192 h. In the present study, an increase in protein carbonyl levels in the liver indicates that normal protein metabolism was disrupted, resulting in accumulation of damaged molecules. Liver TBARS and protein carbonyl were measured in this study as biomarkers to oxidative stress, but both parameters showed a recovery pattern when fish were transferred to herbicide-free water. The sum of results concerning oxidative stress parameters indicate that short time exposure to Roundup[®] is capable to cause oxidative stress in fish tissues. The results also showed that TBARS and protein carbonyl were not effective biomarkers to glyphosate (Roundup[®] 48%) exposure.

SOD and CAT enzymes have related functions [12]. SOD catalyses the dismutation of the superoxide anion radical to water and hydrogen peroxide, which is detoxified by CAT that remove the hydrogen peroxide, which is metabolized to oxygen and water. We did not detect any variation in liver CAT and SOD activities of *R. quelen* for both concentrations after exposure. SOD activity showed reduction in recovery period at the concentration of 0.95 mg/L, while CAT activity showed decreased at both concentrations. The similar results concerning CAT activity were observed in *R. quelen* after 96 h exposure to Roundup[®] [25]. Sevgiler et al. [30] observed no changes in the activities of enzymes SOD and CAT in freshwater fish *Oreochromis niloticus* after etoxazole exposure. However, CAT activity was reduced in the liver of silver catfish after periods tested (12, 24 and 96 h) of exposure to the herbicide clomazone [24]. According with these authors decrease in CAT activity could be due to the flux of superoxide radicals, which has been reported to inhibit CAT activity [29]. Generally considering the integrated function both CAT and SOD increase together to control possible oxidative stress situation. However, in this study an imbalance in antioxidant enzymes activities was observed.

GST is an important enzyme involved in catalyzing the conjugation of a variety of electrophilic substrates to reduced glutathione and protects the cell against effects of xenobiotics [31]. The effects of the pollutants on GST activity have been some that inconclusive, showing induction, no change, or inhibition of the enzyme activity [1, 32]. The induction of GST is considered beneficial to handle a stress condition, but the reduction of activity is little known. The inhibition of activity in hepatic tissue occurs because liver is one of the first organs exposed to the toxicant effects of

pesticides or other pollutants [32]. In the present study, the GST activity was reduced in liver in both concentrations used. This result is in agreement with Ballesteros et al. [32] who observed a decrease in GST in gills, liver and muscle of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. During the period in herbicide-free water an increase of GST activity was observed. A decrease in GST activity during exposure period may suggest a failure in detoxification and occurrence of oxidative stress. However, the increased GST activity observed during recovery period indicates clear detoxification responses against Roundup® toxicity.

It has been observed that when normal enzymatic defenses are stressed, secondary defenses such as vitamin C prevent the autooxidation chain reaction [29]. Ascorbic acid has long been considered an essential factor to ameliorate some of the toxic effects of oxygen radicals [29]. In this investigation, liver ascorbic acid levels did not change significantly after exposure to herbicide and recovery period. Literature data showed different responses concerning ascorbic acid variations after pollutants exposure. Ascorbic acid levels in tissues of *Wallago attu* collected from Panipat after fish-kill episode did not change after the episode [10]. However, a reduction in the ascorbic acid levels in different tissues following treatment with deltamethrin was observed [33]. The absence of response in this parameter observed in this study is probably a defensive reaction of fish to combat stress produced by pesticide. Considering literature data, varied responses were observed as far as ascorbic acid content in fish exposed to different pollutants [29].

In this study, liver non-protein thiols reduced in glyphosate (Roundup® 48%) at concentration of 0.95 mg/L, but this same parameter returned values near control in a recovery period. Furthermore, Parvez et al. [10] observed the significantly higher non-protein thiol levels in the liver of *Wallago attu* collected from Panipat after the fish-kill episode. However, our study found different results, showing decrease non-protein thiol levels in exposure period, but that does not mean that this parameter did not contribute to preventing oxidative stress. In fact, a reduction was observed in exposure period, but analyzing the increase in this parameter in relation recovery and exposure periods we could think in a response of the non-enzymatic antioxidants of fish. The findings of the present study demonstrate that some parameters as non-protein thiols may be used as biomarkers of aquatic pollution.

In the present study, the increase in TBARS levels and protein carbonyl contents shows that the pesticide induced ROS and is not totally scavenged by the

antioxidant enzymes. The activity of antioxidants may be increased or inhibited under chemical stress depending on the intensity and the duration of the stress applied [34]. In this study, antioxidant defenses were low intensity, but completely restored when fish were put in clean water. The sum of results obtained indicates damage in the antioxidant response to fish tissue against Roundup[®] induced toxicity. However, considering the recovery pattern observed the herbicide studied seem to be safe for *Rhamdia quelen*.

5. Conclusion

The results obtained allow us to conclude that commercial formulation of Roundup[®] affected some toxicological parameters of *R. quelen*, indicating that short-term exposure could affect temporarily fish health conditions. Roundup[®] induces oxidative stress due to increase in lipid peroxidation and carbonylation of proteins. The oxidative stress condition impairs antioxidants response, and in this line, some biomarkers to evaluate herbicide toxicity. Thus, the low response in antioxidant pattern could determine fish response against herbicide induce toxicity and impair physiological condition. After recovery period in clean water most of the toxicological parameters were recovered, showing a response of the fish to oxidative stress caused by herbicide exposure. The recovery patterns demonstrate that from the ecophysiological point of view, this herbicide could be considered safe to *Rhamdia quelen*. Future studies are needed to select indicators of antioxidant impacts of pesticides in fish tissues and also to better understand mechanisms involved in potential recovery pattern observed in this fish species.

References

- [1] F. Peixoto, D. Alves-Fernandes, D. Santos, A. Fontainhas-Fernandes, Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*, *Pest. Biochem. Physiol.* 85 (2006) 91-96.
- [2] P.M. Abdullah, J. Daud, S.K. Hong, H.C. Yew, Improved method for the determination of glyphosate in water, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 363-369.
- [3] W. Jiraungkoorskul, E.S. Upatham, M. Kruatrachue, S. Sahaphong Vichasri-Grams, P. Pokethitiyook, Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Sci. Asia* 28 (2002) 121-127.
- [4] M.T.K. Tsui, L.M. Chu, Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors, *Chemosphere* 52 (2003) 1189-1197.
- [5] B.N. Rodrigues, F.S. Almeida, *Guia de Herbicidas*, Londrina, Paraná-Brazil, 1998, pp. 648.
- [6] J.P. Giesy, S. Dobson, K.R. Solomon. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167 (2000) 35-120.
- [7] L.J.G. Barcellos, L.C. Kreutz, L.B. Rodrigues, I. Fioreze, R.M. Quevedo, L. Cericato, J. Conrad, A.B. Soso, M. Fagundes, L.A. Lacerda, S. Terra, Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress, *Aquacult. Res.* 34 (2004) 1465-1469.
- [8] C.B.G. Ruas, C.S. Carvalho, H.S.S. de Araújo, E.L.G. Espíndola, M.N. Fernandes, Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 71(2008) 86-93.
- [9] J. E. McCarthy, I. R. Shugart, in: J. F. McCarthy, L.R. Shugart (Eds.), *Biological markers of environmental contamination*, Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1990, pp. 3-14.
- [10] S. Parvez, S. Pandey, M. Ali, S. Raisuddin, Biomarkers of oxidative stress in *Wallago attu* (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India, *Sci. Total Environ.* 368 (2006) 627-636.

- [11] L.M. Cardoso, D.S.A. Colombari, J.V. Menani, P.M. De Paula, D.A. Chianca, E. Colombari, Espécies reativas de oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial, *Medicina, Ribeirão Preto* 39 (1) (2006) 77-88.
- [12] D.A. Monteiro, J.A. Almeida, F.T. Rantin, A.L. Kalinin, Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion), *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 143 (2006) 141-149.
- [13] X. Zhang, F. Yang, X. Zhang, Y. Xu, T. Liao, S. Song, J. Wang, Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD), *Aquat. Toxicol.* 86 (2008) 4-11.
- [14] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 302-309.
- [15] L.J. Yan, M.G. Traber, L. Packer, Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins, *Anal. Biochem.* 228 (1995) 349–351.
- [16] D.P. Nelson, L.A. Kiesow, Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV), *Anal. Biochem.* 49 (1972) 474-478.
- [17] J.M. Mc Cord, I. Fridovich, Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049-6055.
- [18] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jacoby, Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130-7139.
- [19] J.H. Roe, In: D. Glick (Ed.), *Methods of Biochemical Analysis*. Interscience, Vol. 1, New York, 1954, p. 115–139.
- [20] M.C. Jacques-Silva, C.W. Nogueira, L.C. Broch, E.M. Flores, J.B.T. Rocha, Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice, *Pharmacol. Toxicol.* 88 (2001) 119-127.
- [21] A.F. Boyne, G.L. Ellman, A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal. Biochem.* 46 (1972) 639–653.
- [22] M.M.A. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

- [23] D.R Livingstone, Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms, *Marine Poll. Bull.* 42 (2001) 656-666.
- [24] M. Crestani, C. Menezes, L. Gluszczak, D.S. Miron, R. Spanevello, A. Silveira, F.F. Gonçalves, R. Zanella, V.L. Loro, Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern, *Chemosphere* 67 (2007) 2305-2311.
- [25] L. Gluszczak, D.S. Miron, B.S. Moraes, R.R. Simões, M.R.C. Schetinger, V.M. Morsch, V.L. Loro, Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*), *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 146 (2007) 519-524.
- [26] E.O. Oruç, Y. Sevgiler, N. Uner, Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl, *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 137 (2004) 43-51.
- [27] S. Parvez, S. Raisuddin, Protein carbonyl: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch), *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20 (2005) 112-117.
- [28] D. Miron, A. Pretto, M. Crestani, L. Gluszczak, M.R. Schetinger, V.L. Loro, V.M. Morsch, Biochemical effects of clomazone herbicide on piavas (*Leporinus obtusidens*), *Chemosphere* 74 (2008) 1-5.
- [29] I. Sayeed, S. Parvez, S. Pandey, B. Bin-Hafeez, H. Rizwanul, S. Raisuddin, Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 56 (2003) 295–301.
- [30] Y. Sevgiler, N. Oruç, N. Üner, Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*, *Pest. Biochem. Physiol.* 78 (2004) 1-8.
- [31] A. Ferrari Venturino, A.M. Pechén de D'Angelo, Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes, *Pest. Biochem. Physiol.* 88 (2007) 134-142.
- [32] M.L. Ballesteros, D.A. Wunderlin, M.A. Bistoni, Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan, *Ecotoxicol. Environ.* 72 (2009) 199-205.
- [33] M. Datta, A. Kaviraj, Ascorbic acid supplementation of diet for reduction of deltamethrin induced stress in freshwater catfish *Clarias gariepinus*, *Chemosphere* 53 (2003) 883-888.

- [34] E.O. Oruç, D. Usta, Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*, Environ. Toxicol. Pharmacol. 23 (2007) 48-55.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. TBARS levels in brain, muscle and liver of *Rhamdia quelen* after (A) exposure to Roundup[®] and recovery period (B). Data are reported as mean \pm standard deviation (n=8). Different capital letters indicate significant difference among exposure concentrations and different lowercase letters indicate difference between exposure and recovery periods by the Tukey test ($P < 0.05$).

Figure 2. Protein carbonyl levels in liver of *Rhamdia quelen* after of exposure to Roundup[®] and recovery period. Data are reported as mean \pm standard deviation (n=8). Different capital letters indicate significant difference among exposure concentrations and different lowercase letters indicate difference between exposure and recovery periods by the Tukey test ($P < 0.05$).

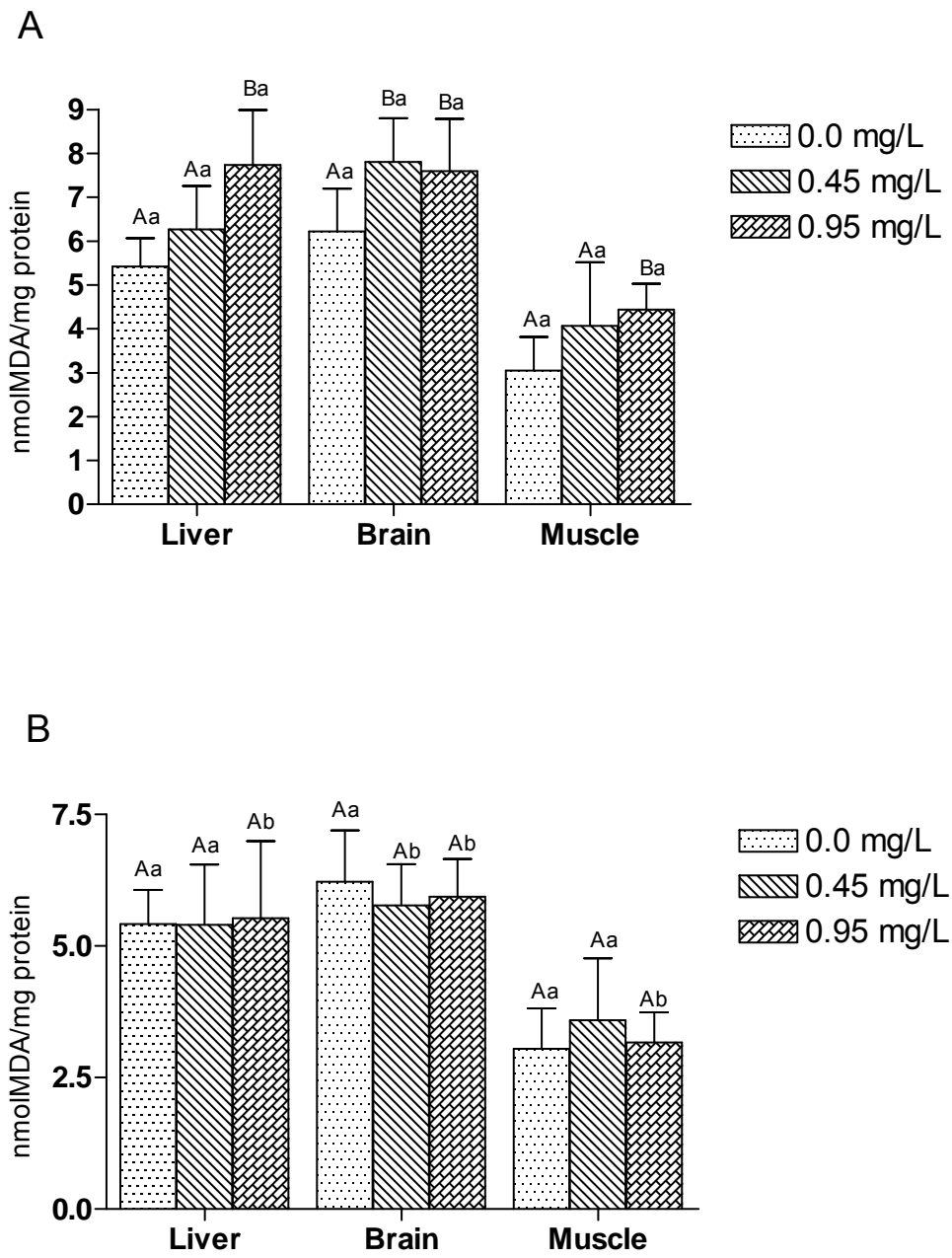


Fig.1

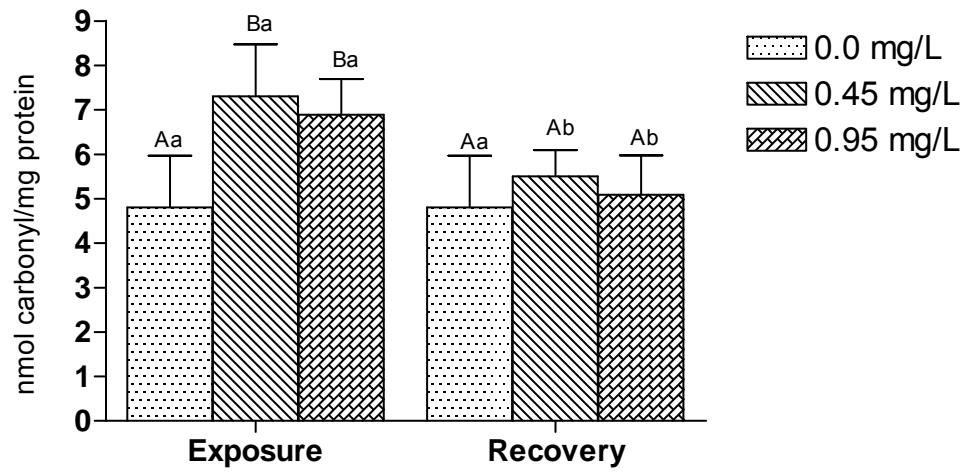


Fig. 2

Table 1. Activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the liver of silver catfish exposed to the herbicide Roundup® and after recovery period.

CAT		Exposure	Recovery
Control		0.065±0.017 ^{Aa}	0.065±0.017 ^{Aa}
[0.45]		0.063±0.008 ^{Aa}	0.029±0.007 ^{Bb}
[0.95]		0.075±0.013 ^{Aa}	0.030±0.009 ^{Bb}
SOD		Exposure	Recovery
Control		5.24±0.72 ^{Aa}	5.24±0.72 ^{Aa}
[0.45]		5.64±0.59 ^{Aa}	5.71±1.01 ^{Aa}
[0.95]		5.99±0.69 ^{Aa}	2.82±0.99 ^{Bb}
GST		Exposure	Recovery
Control		0.194±0.047 ^{Aa}	0.194±0.047 ^{Aa}
[0.45]		0.113±0.021 ^{Ba}	0.292±0.110 ^{Bb}
[0.95]		0.114±0.022 ^{Ba}	0.368±0.090 ^{Bb}
Ascorbic acid		Exposure	Recovery
Control		10.27±1.27 ^{Aa}	10.27±1.27 ^{Aa}
[0.45]		12.08±2.07 ^{Aa}	10.28±0.74 ^{Ab}
[0.95]		11.34±1.95 ^{Aa}	9.54±0.80 ^{Ab}
Non-protein thiols		Exposure	Recovery
Control		2.49±0.24 ^{Aa}	2.49±0.24 ^{Aa}
[0.45]		2.17±0.24 ^{Aa}	2.61±0.34 ^{Ab}
[0.95]		2.08±0.34 ^{Ba}	2.62±0.29 ^{Ab}

SOD: superoxide dismutase (UI SOD/ mg protein); GST: glutathione S-transferase ($\mu\text{mol GS-DNB/ min/mg protein}$); CAT: catalase ($\mu\text{mol/mg protein/min}$); Ascorbic acid ($\mu\text{g/g tissue}$); Non-protein thiols ($\mu\text{mol SH-/g tissue}$). Data are reported as mean \pm standard deviation ($n = 8$). Different capital letters indicate significant difference among exposure concentrations (column) and different lowercase letters indicate difference exposure and recovery periods (line) by the Tukey test ($P < 0.05$).

4.2 Manuscrito 2

Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI) in response to herbicide
clomazone and recovery pattern

Charlene Cavalheiro de Menezes^a, Vania Lucia Loro^{a*}, Milene Braga da Fonseca^a,
Roberta Cattaneo^a, Alexandra Pretto^a, Denise dos Santos Miron^a and Adriana Santi^b

Submetido para a revista Ecotoxicology and Environmental Safety

Oxidative parameters of *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI) in response to herbicide
clomazone and recovery pattern

Charlene Cavalheiro de Menezes^a, Vania Lucia Loro^{a*}, Milene Braga da Fonseca^a,
Roberta Cattaneo^a, Alexandra Pretto^a, Denise dos Santos Miron^a and Adriana Santi^b

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica - Laboratório de
Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química, Universidade Federal de
Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de
Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Corresponding Author:

(*) Dr. Vania Lucia Loro.

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55-3220-9456

Fax: 55-3220-8240

E-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

Toxic parameters were examined in fish tissues and recovery capacity after clomazone exposure. Fish were exposed to 0.45 and 0.91 mg L⁻¹ of clomazone for eight days and then allowed to equal recovery period. Toxicological parameters and antioxidant profile were measured. Herbicide exposure increased TBARS levels in muscle at both concentrations and in liver at higher concentration, however, in brain no alterations were recorded. Protein carbonyls increased, and catalase activity did not change in liver of fish exposed. SOD activity enhanced in liver at the concentration of 0.91 mg L⁻¹. GST activity, ascorbic acid and non-protein thiol levels increased in liver at both concentrations. At the end of the recovery period most of the parameters recovered, whereas GST and ascorbic acid remained elevated. Our findings demonstrate the occurrence of disorders in fish antioxidant parameters and are of importance in the assessment of the potential risk of herbicides as clomazone on fish species.

KeyWords: Clomazone; *Rhamdia quelen*; oxidative stress; antioxidant profile

1. Introduction

In recent years, there has been an increase in concern about environmental contamination. One of the factors contributing to this contamination is the frequent use of pesticides in agriculture (Sancho et al., 2000; Oruç et al., 2004). The occurrence of pollutants in aquatic environments can affect the health and survival of fish (Dezfuli et al., 2003). The water leaving the fields, for example, can directly or indirectly affect the lives of many non-target organisms such as fish (Oruç and Üner, 1999; Bretaud et al., 2000). Recently, a large number of studies have shown effects of pesticides on aquatic organisms, especially studies using sub-lethal concentrations of the products (Sayeed et al., 2003, Crestani et al., 2006; Moraes et al., 2007; Fonseca et al., 2008).

Clomazone herbicide, which belongs to the class isoxazolidinone, is widely used in agriculture, especially in paddy rice fields in Southern Brazil (Rodrigues and Almeida, 2005). This herbicide is highly effective, however, it causes groundwater contamination due to its high water solubility (1100 mg L^{-1}) and long half-life dissipation, averaging from 28 to 84 days (Zanella et al., 2002). It has also been reported to contaminate surface waters and at concentrations used in agriculture it affects metabolic and oxidative parameters of different fish species (Crestani et al., 2006; Moraes et al., 2007).

Silver catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptateridae) was chosen for this study because it is a native teleost fish from South America and is an economically important species from southern Brazil. This fish is well adapted to the cold winter months and has a fast growth rate during the warmer months of the year, reaching a body weight of 600–800 g in 8 months (Barcellos et al., 2004).

Environmental contaminants, including pesticides, may cause an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) in different aquatic organisms such as fish causing impairment of many cellular functions (Ahmad et al., 2000; Üner et al., 2006). When intracellular ROS increase, the capacity of antioxidant defense may be impaired and an imbalance between oxidants and antioxidants occur generating the oxidative stress (Üner et al., 2006). The enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) are responsible for cellular protection against ROS. Studies show that when the activities of these enzymes are changed in fish tissues, they can be used as indicators of exposure to aquatic

pollutants (Ahmad et al., 2000; Li et al., 2003, Moraes et al., 2007). The typical reaction during ROS-induced damage involves the peroxidation of unsaturated fatty acids increasing tissue MDA levels. Lipid peroxidation phenomenon and protein carbonylation indicating possible damage to lipids and proteins could be used as biomarker of pesticide exposure (Sayeed et al., 2003, Almroth et al., 2005, Oropesa et al., 2009).

The objective of the present study was to investigate the effects of clomazone herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant profile in *Rhamdia quelen* towards a short-term exposure. Toxicological parameters and antioxidant profile were evaluated also considering a recovery pattern in herbicide-free water.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The herbicide clomazone {2-[(2-chlorophenyl)-methyl]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone} used in this study was obtained commercially from the FMC Corporation (Gamit; 50% purity, Philadelphia, EUA). Malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA), sodium dodecyl sulfate (SDS), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), bovine serum albumin, hydrogen peroxide (H₂O₂) and others reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Fish

Juvenile silver catfish of both sexes with an average weight of 20.0 ± 1.0 g and measuring 11.0 ± 1.0 cm length were obtained from a fish farm (RS, Brazil). Fish were acclimated to laboratory conditions for 10 days, in tanks (250 L) prior to the experiments. They were kept in continuously aerated water with a static system and with a natural photoperiod (12h light/12h dark). During acclimation and all experimental period the average of water parameters were: temperature 24.0 ± 2.0 °C, pH 6.5 ± 0.2 units, dissolved oxygen 6.2 ± 2.0 mg L⁻¹, non ionized ammonia 0.7 ± 0.01 µg L⁻¹, nitrite 0.05 ± 0.01 mg L⁻¹. During acclimation and experimental

period fish were fed once a day with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). Sewage and pellet leavings were removed every other day by suction.

2.3. Experimental design

The clomazone concentration usually recommended in rice fields is of 0.4 to 0.7 mg L⁻¹ (Rodrigues and Almeida 2005), thus initial measured concentrations of 0.45 and 0.91 mg L⁻¹ were chosen for our experiments. This measurement includes only active ingredient clomazone that was measured in the beginning and final of experimental period for high performance liquid chromatography (HPLC) (Zanella et al., 2002) (Table 1). The herbicide was added to the water only at the beginning of the experiment. Stock solutions were prepared by dissolving clomazone in water and this solution was added to the experimental boxes. After the acclimation period, the fish were redistributed in 250 L boxes in number the eight per box (duplicate). Fish were exposed for eight days to clomazone. After the exposure, the fish were killed by punching the spinal cord behind the opercula and half the fish of each box (4) were sampled and tissues were collected (brain, liver and white muscle). The transferred remaining for boxes contends water without herbicide for eight day for recovery periods. The water in the boxes was not renewed to maintain the concentration of clomazone during the period of exposure. The filter systems were used to maintain water quality. Water quality parameters during the experimental period were maintained equal those of the acclimation period. This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria reference number: 23081.010372/2008-58.

2.4. Determination of lipid peroxidation

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 homogenates (100-400 µL) were added trichloroacetic acid 10% (TCA) 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 nmol MDA mg protein⁻¹ according to Buege and Aust (1978).

2.5. Protein Carbonil assay

The liver tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 using a glass homogenizer. Protein carbonyl content was assayed by the method described by Yan et al. (1995) with some modifications. Soluble protein (1.0 mL) was reacted with 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2N hydrochloric acid (HCl). 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 for 15 min. Then, the protein isolated from the interface was washed twice by resuspension in ethanol/ethyl acetate (1:1), and suspended in 1.0 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 2N HCl without DNPH was included for each sample. The total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22.000 M cm⁻¹ and expressed in nmol carbonil mg protein⁻¹.

2.6. Antioxidant enzymes

Catalase (EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesov, 1972). Liver tissue were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 (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 (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 spectrophotometry at 240 nm. Catalase activity was calculated and expressed in μmol min⁻¹mg protein⁻¹. SOD activity was performed in liver tissue and is based on inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by Cord and Fridovich (1969). In this method, SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that

inhibits by 50% the speed of oxidation of adrenalin. The oxidation of adrenalin leads to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH10) and adrenalin (1 mM). The activity was expressed in UI SOD mg protein⁻¹. GST activity 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 molar extinction coefficient used for CDNB was 9.6 mM⁻¹cm⁻¹. The activity was expressed as $\mu\text{mol GS-DNB min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$.

2.7. Non-enzymatic antioxidants

Ascorbic acid and non-protein thiol were studied as non-enzymatic antioxidants. Ascorbic acid content was determined by Jacques-Silva et al. (2001). Tissue (100 mg) was homogenized with Tris HCl 50 mM (pH 7.5) followed by centrifugation. An aliquot the supernatants (1.0 mL) mixed with 1.0 mL trichloroacetic acid 10% followed by centrifugation. An aliquot the supernatants (300 μL) was used for determination with 2,4-dinitrophenylhydrazine (4.5 mg mL⁻¹), 0.6 mg mL⁻¹ thiourea, CuSO₄ (0.075 mg mL⁻¹) and trichloroacetic acid 13.3% and incubated for 3 h at 37°C. Then H₂SO₄ 65% (v/v) was added to the medium. The ascorbic acid levels were expressed as $\mu\text{mol ASA g of liver}^{-1}$.

Non-protein thiols levels were determined in liver by the method of Boyne and Ellman (1959). Tissue (100 mg) was homogenized with Tris HCl 50 mM (pH 7.5) followed by centrifugation at 3.000 X g for 10 min. An aliquot the supernatants (1.0 mL) mixed with 1.0 mL trichloroacetic acid 10% followed by centrifugation. After an aliquot the supernatants (400 μL) is used the determination with 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 10 mM (DTNB) and phosphate buffer 0.5 mM (pH 6.8) the reaction was followed at 412 nm. The non-protein thiols levels were expressed as $\mu\text{mol SH g of liver}^{-1}$.

2.8. Protein determination

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

2.9 Statistical procedures

Statistical analyses were performed using two-way analyses of variance (ANOVA) to determinate concentration and time effects. Means were compared by Tukey test and expressed as mean \pm standard deviation (n=8). Differences were considered to be significant between groups at a probably level of ($P < 0.05$).

3. Results

The result concerning clomazone showed that fish absorption was about 40% of initial measured concentrations (Table 1). The majority of observed results in fish tissues could be due to fish herbicide retention. Fish exposed to a commercial formulation containing clomazone showed increased TBARS levels in liver in a proportion of 61% at the concentration of 0.91 mg L^{-1} when compared with the control group ($P < 0.05$) (Table 2). No significant changes were recorded at the concentration of 0.45 mg L^{-1} (Table 2). TBARS levels were increased in the muscle at the concentration of 0.45 mg L^{-1} (148%) and 0.91 mg L^{-1} (116%) of herbicide in relation to the control group ($P < 0.05$) (Table 2). TBARS levels did not show any alteration in the brain tissue of fish exposed to clomazone at both concentrations tested when compared with control values (Table 2). A recovery in TBARS levels was observed and values returned to the control in the liver and muscle after eight days in herbicide-free water (Table 2). TBARS levels in the liver showed a significant difference between the exposure and recovery period only at the highest concentration studied. There was a decrease of 31% in TBARS levels at the concentration of 0.91 mg L^{-1} in relation to same concentration in the exposure period ($P < 0.05$) (Table 2). In the muscle there was a decrease in both concentrations tested in recovery period when compared with the exposure period. A decrease rate was in the proportion of 54% and 52% in 0.45 and 0.91 mg L^{-1} , respectively ($P < 0.05$) (Table

2). Comparing TBARS levels in brain tissue in the exposure and recovery periods we observed a reduction of 6% and 14% at the concentrations of 0.45 mg L⁻¹ and 0.91 mg L⁻¹, respectively ($P<0.05$) (Table 2).

A significant increase of protein carbonyl in the liver was observed after exposure period at both concentrations tested. This increase was 189% and 195% at the concentrations of 0.45 mg L⁻¹ and 0.91 mg L⁻¹, respectively ($P<0.05$) (Figure 1). Protein carbonyl content returned to values next to control in the recovery period. In the recovery period the concentration of 0.45 mg L⁻¹ showed a decrease of 72% in protein carbonyl content when compared with the exposure period ($P<0.05$) (Figure 1). For the concentration of 0.91 mg L⁻¹ there was a reduction of 65% of this parameter in relation to exposure period ($P<0.05$) (Figure 1).

Our study showed that silver catfish exposed to both concentrations of clomazone did not show alterations in CAT activity in relation with control group (Table 3). On the contrary, there was a significant increase of CAT activity at both concentrations tested in the recovery period compared with the control group ($P<0.05$) (Table 3). Comparing exposure and recovery periods, the recovery group of 0.45 mg L⁻¹ showed an increase of 60% in the CAT activity when compared to the value observed in the exposure group ($P<0.05$) (Table 3). The concentration of 0.91 mg L⁻¹ did not show alteration of the CAT activity as compared with the exposure group (Table 3).

The SOD activity in liver enhanced during the exposure period at the concentration 0.91 mg L⁻¹ in the proportion of 23% when compared with the control group ($P<0.05$) (Table 3). SOD activity returned to values next to control in the recovery period. Comparing the exposure with recovery periods, a significant decrease of SOD was observed (28%) at the concentration of 0.91 mg L⁻¹ ($P<0.05$) (Table 3).

The present study showed that herbicide exposure increase GST activity. The increase observed was 51% and 93% at the concentrations of 0.45 mg L⁻¹ and 0.91 mg L⁻¹, respectively compared to the control group ($P<0.05$) (Table 3). In the recovery period, an increase in GST activity of 14% and 27% at the concentrations of 0.45 mg L⁻¹ and 0.91 mg L⁻¹, respectively, was observed when compared to the control group ($P<0.05$) (Table 3). Comparing the periods of exposure and recovery we observed that there was a significant GST decrease at the concentration of 0.45

(23%) and 0.91 mg L⁻¹ (34%) in the recovery period ($P<0.05$) (Table 3). However, GST activity remained high in the recovery period (Table 3).

In relation to non-enzymatic antioxidants, the levels of ascorbic acid enhanced during exposure and recovery periods at both herbicide concentrations tested reaching 33% ($P<0.05$) (Table 3). However, comparing exposure and recovery periods there was a significant decrease in ascorbic acid levels in the recovery period that corresponding to 11% and 10% at the concentrations 0.45 e 0.91 mg L⁻¹, respectively ($P<0.05$) (Table 3). Similarly, to GST activity, ascorbic acid did not exhibit a recovery pattern (Table 3).

The levels of non-protein thiols increased significantly at the concentrations of 0.45 and 0.91 mg L⁻¹ in the exposure period ($P<0.05$) and returned to control values after eight days in herbicide-free water (Table 3). Comparing periods of exposure and recovery, a significant decrease of 36% and 23% at the concentrations of 0.45 mg L⁻¹ and 0.91 mg L⁻¹, respectively was observed in the recovery period ($P<0.05$) (Table 3).

Discussion

Clomazone induce lipids and protein damage evidenced by TBARS and carbonyl increased during exposure period. However, oxidative stress phenomenon did not persist during recovery in clean water. The lipid peroxidation (LPO) in this study was measured through the levels of TBARS in tissues of *R. quelen*. TBARS has used as a biomarker of oxidative stress in fish and has been suggested to be one of the molecular mechanisms involved in pesticide-induced toxicity as well as a major contributor to the loss of cell function under oxidative stress conditions (Sayeed et al., 2003; Monteiro et al., 2006; Sevgiler et al., 2007). Considering that, the typical reaction during ROS-induced damage involves the peroxidation of unsaturated fatty acids, our results clearly showed that clomazone exposure led to oxidative stress, showing significant increases of TBARS levels in liver and white muscle tissue. The results of present study demonstrated clomazone oxidative-stress-inducing effects on *R. quelen*, being that liver and white muscle were the most affected organs. In a similar experimental model, Crestani et al. (2007) showed TBARS levels increased in liver of *Rhamdia quelen* after 12, 24, 48, 96 and 192 h of exposure to clomazone. Li et al. (2003) also observed increased TBARS levels in

liver of *Carassius auratus* exposed for 15 days to 0.4 mg L^{-1} of 3,4-dichloroaniline, a chemical used in the synthesis of herbicide. However, in this study, TBARS levels in the brain tissue of silver catfish did not show any variation. The sum of results concerning TBARS could indicate a tissue specific response against lipid peroxidation phenomenon. These results indicate that the acute clomazone exposure at the concentrations used in rice fields is associated with liver and muscle lipid peroxidation in silver catfish. Similar results were observed in field experiments where liver and muscle MDA levels in fish from “Molinos de Matachel” reservoir (water contaminated with simazine herbicide) were increased in comparison to fish from reference reservoir (Oropesa et al., 2009). In the current study when fish exposed to herbicide were transferred to herbicide-free water, TBARS levels in the liver and muscle returned to control values, showing that this parameter exhibited a recovery pattern. In agreement with our results Miron et al. (2008) observed that liver TBARS levels increased after 192 h of exposure to clomazone and returned to control values after equal period of recovery. Elevation of lipid peroxidation in this study suggests participation of free radical induced oxidative cell injury mediated by clomazone toxicity. Taken together, water clomazone measurements and recovery of TBARS levels may indicate an attempt to adapt and compensate herbicide induced oxidative stress, due to possible clomazone retention in tissues of *R. quelen*.

Protein carbonyl levels enhanced after exposure to clomazone. It is suggested that measurement of carbonyl groups may provide a convenient technique for detecting and quantifying oxidative modification of proteins during oxidative stress. In this study, a significant increase in protein carbonyls was observed in response to exposure to clomazone herbicide in liver tissue at both concentrations used, and returned to the control after eight days in water without herbicide. Parvez & Raisuddin (2005) observed a significant increase in the protein carbonyl content in gills, kidney and liver in the *Channa punctata* (Bloch) after 48 h exposure to deltamethrin, endosulfan and paraquat. Miron et al. (2008) also observed an increase in protein carbonyl in the liver of *Leporinus obtusidens* exposed to the herbicide clomazone at the concentration of 0.5 mg L^{-1} after 96 and 192 h, being that this increase persisted after the recovery period of 192 h. Protein oxidation can lead to loss of sulfhydryl groups in addition to modification of amino acids leading to the formation of carbonyl and other oxidized moieties (Parvez & Raisuddin; 2005). Oxidative stress phenomenon was generated by clomazone exposure due to an

increase in protein carbonyl and TBARS levels, however, this phenomenon did not persist when fish were transferred to herbicide-free water, indicating a short-term toxicity induced by clomazone.

Variations in antioxidant enzyme activities have been proposed as indicators of pollutant mediated oxidative stress (Ahmad et al., 2000; Sayeed et al., 2003). In this investigation, the CAT activity did not significant change after exposure to the herbicide used at both concentrations. Gluszczak et al. (2007) observed that the CAT activity in the liver the *R. quelen* did not change after 96 h exposure to Roundup. Crestani et al. (2007) showed a reduction of the CAT activity in the liver of silver catfish after periods tested (12, 24 and 96 h) of exposure to the herbicide clomazone. Although the results in the present study did not demonstrate alterations in the liver CAT activity, we should not overlook the hypothesis of oxidative stress in the liver tissue. Oxidative stress generated by increased protein carbonyl and TBARS levels may have suppressed antioxidant defenses enzyme activities, due to their oxidative damage (Moraes et al., 2007). Thus, results concerning CAT activity suggested a possible oxidative liver damage and CAT increase after recovery probably helping to detoxify the herbicide.

A period of eight days of exposure to herbicide was enough to induce significant alterations in antioxidants such as SOD, GST, ascorbic acid and non-protein thiols. Antioxidative enzymes such as SOD and GST were significantly increased in liver of fish treated with clomazone herbicide. Activities of these enzymes are often enhanced in situations of oxidative stress as an adaptive response to help detoxify oxygen free radicals and prevent damage to macromolecules (Ballesteros et al., 2009). The SOD activity increased after eight days of exposure to clomazone at the concentration of 0.91 mg L^{-1} , while the activity of GST increased at both concentrations. The herbicide may be interacting primarily with the liver, resulting in an increase in the enzyme activities through increased reactive oxygen radicals as a result of stress condition in the fish. The increased activity of SOD is known to serve as protective responses to eliminate reactive free radicals (Cheung et al., 2001). The antioxidant GST has been shown to be sensitive indicators of increased oxidative stress in *Mugil sp.* obtained from a polluted area containing high concentrations of polyaromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, and pesticides (Rodriguez-Ariza et al., 1993). An increased GST activity in tissues may indicate the development of a defensive mechanism to counteract the

effects of clomazone and may reflect the possibility of a more efficient protection against pesticide toxicity.

It has been observed that when normal enzymatic defenses are stressed, secondary defenses such as ascorbic acid prevent the autooxidation chain reaction. Ascorbic acid has long been considered an essential factor to ameliorate some of the toxic effects of oxygen radicals (Sayeed et al., 2003). In this study, ascorbic acid levels were increased in the liver at both concentrations and remained increased after the recovery period. Elevated ascorbic acid levels have been reported in the liver of fish exposed to waste water from paper and pulp mills (Andersson et al., 1988). Sayeed et al. (2003) observed increased acid ascorbic levels in the kidney and liver, while the opposite was observed in the gills in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) exposed to deltamethrin.

In this study, liver non-protein thiols increased at both concentrations after exposure to herbicide. Our study is in agreement with Parvez et al. (2006) observed significant higher non-protein thiol levels in the liver of *Wallago attu* collected from town of Panipat after the fish-kill episode. After the recovery period, non-protein thiols levels remained increased in relation to the control group. Non-protein thiol possesses antioxidant properties and its protective role against oxidative stress induced toxicity in aquatic animals (Sayeed et al., 2003). Although the sum of results indicates that fish absorb until 40% of clomazone active ingredient, the majority of the parameters could be recovered indicating fish tissue adaptation to toxic situation.

Results concerning toxicological parameters are early indicators of rice field herbicide exposure. The present study showed that commercial formulations containing clomazone herbicide at rice field concentrations may cause disorders in fish health. Some parameters were recovered in clean water, indicating low toxicity potential for clomazone at the tested concentrations. Besides, GST and ascorbic acid can be used to evaluate clomazone toxicity in *Rhamdia quelen* at environmental relevant concentration.

References

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand H.S., Jain, S.K., Altran, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 37-48.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Förlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparous*), measured as protein carbonyl and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73, 171-180.
- Andersson, T., Forlin, L., Hardig, J., Larsson, A., 1988. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 1525–1536.
- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72, 199-205.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Fagundes, M., Lacerda, L.A., Terra, S., 2004. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard *Pimelodidae*): changes after acute stress. *Aquacult. Res.* 34, 1465-1469.
- Boyne, A.F., Ellman G.L., 1972. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal. Biochem.* 46, 639–653.
- 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.
- Bretauadt, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 47, 117-124.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-309.
- Cheung, C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Between tissue concentrations of polycyclicaromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels (*Perna viridis*). *Aquat. Toxicol.* 52, 189-203.

- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D., Lazzari, R., Duarte, M., Morsch, V.M., Pippi, M.V., Vieira, V.P., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 65, 48–55.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67, 2305-2311.
- Dezfuli, B.S., Giari, L., Simoni, E., Palazzi, D., Maneras, M., 2003. Alteration of rodlet cells in chub caused by the herbicide Stam® M-4 (Propanil). *J. Fish Biol.* 63, 232-239.
- Fonseca, M.B., Gluszczak, L., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Gonçalves, F.F., Loro, V.L., 2008. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 69, 416-420.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol.* 146, 519-524.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119-127.
- Li, W., Yin, D., Zhou, Y., Hu, S., Wang, L., 2003. 3,4 - Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of *Carassius auratus*. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 56, 251-255.
- Mc Cord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Miron, D., Pretto, A., Crestani, M., Gluszczak, L., Schetinger, M.R., Loro, V.L., Morsch, V.M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piavas (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74, 1-5.
- 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. Part C* 143, 141-149.
- Moraes, B.S., Loro, V.L., Gluszczak, 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.
- 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., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 137, 43-51.
- Oropesa, A.L., Cambero, J.P.G., Soler, F., 2009. Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Toxicol.* 23, 285-293.
- Oruç, E.Ö., Üner, N., 1999. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environ. Pollut.* 105, 267-272.
- Parvez, S., Pandey, S., Ali, M., Raisuddin, S., 2006. Biomarkers of oxidative stress in *Wallago attu* (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. *Sci. Total Environ.* 368, 627-636.
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyl: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112-117.
- Rodriguez-Arizaetal, A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J., 1993. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 2568-2573.
- Rodrigues, N.R. Almeida, F.S., 1998. Guia de Herbicidas, fourth ed. Londrina, PR, Brasil, pp. 137–142.
- Sancho, E., Fernandez-Véga, C., Sanchez, M., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., 2000. Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 46, 57-63.

- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Rizwanul, H., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 56, 295-301.
- Sevgiler, Y., Piner, P., Durmaz, H., Üner, N., 2007. Effects of *N*-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 87, 248-254.
- Uner, N., Oruc, E.O., Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H., Usta, D., 2006. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 241-245.
- 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., Machado, S.L.O., Gonçalves, F.F., Marchezan, E., 2002. Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Chromatographia* 55, 573-577.

FIGURE CAPTION

Figure 1. Protein carbonyl levels in liver of *Rhamdia quelen* after of exposure to clomazone and recovery period. Data are reported as mean \pm standard deviation (n=8). Different capital letters indicate significant difference among exposure concentrations and different lowercase letters indicate difference between exposure and recovery periods by the Tukey test ($P < 0.05$).

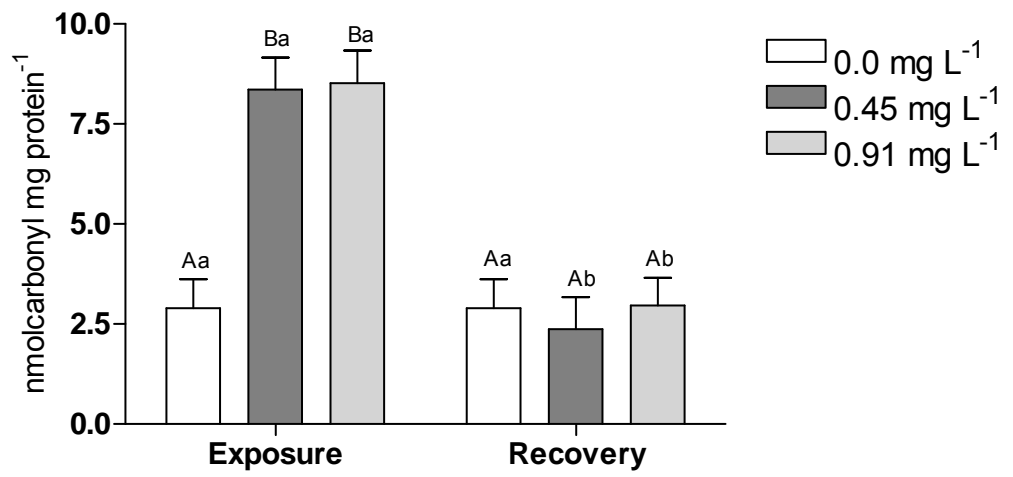


Fig.1

Table 1. Concentration of clomazone herbicide in water samples.

Concentration placed in the water	Measured concentration 1° day	Measured concentration 8° day
1.0 mg L ⁻¹	0.910 mg L ⁻¹	0.365 mg L ⁻¹
0.5 mg L ⁻¹	0.455 mg L ⁻¹	0.182 mg L ⁻¹

Table 2. TBARS levels in liver, muscle and brain of silver catfish exposed to the herbicide clomazone (8 days) and equal recovery period.

Liver		Exposure	Recovery
	Control	3.17±0.45 ^{Aa}	3.17±0.45 ^{Aa}
	[0.45]	3.72±0.40 ^{Aa}	3.70±0.43 ^{Aa}
	[0.91]	5.10±0.61 ^{Ba}	3.54±0.68 ^{Ab}
Muscle			
	Control	1.96±0.43 ^{Aa}	1.96±0.43 ^{Aa}
	[0.45]	4.86±0.72 ^{Ba}	2.21±0.40 ^{Ab}
	[0.91]	4.24±0.59 ^{Ba}	2.03±0.47 ^{Ab}
Brain			
	Control	5.82±0.45 ^{Aa}	5.82±0.45 ^{Aa}
	[0.45]	6.12±0.60 ^{Aa}	5.74±0.46 ^{Ab}
	[0.91]	6.10±0.26 ^{Aa}	5.26±0.89 ^{Ab}

TBARS: thiobarbituric acid reactive species were expressed as (nmol MDA mg protein⁻¹). Data are reported as mean ± standard deviation (n=8). Different capital letters indicate significant difference among exposure concentrations and different lowercase letters indicate difference between exposure and recovery periods by the Tukey test ($P < 0.05$).

Table 3. Activity of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the liver of silver catfish exposed to the herbicide clomazone and after recovery period.

CAT		Exposure	Recovery
Control		0.039±0.003 ^{Aa}	0.039±0.003 ^{Aa}
[0.45]		0.040±0.005 ^{Aa}	0.064±0.003 ^{Bb}
[0.91]		0.044±0.006 ^{Aa}	0.053±0.012 ^{Ba}
SOD		Exposure	Recovery
Control		4.56±0.49 ^{Aa}	4.56±0.49 ^{Aa}
[0.45]		5.00±0.50 ^{Aa}	4.43±0.30 ^{Aa}
[0.91]		5.61±0.24 ^{Ba}	4.01±0.15 ^{Ab}
GST		Exposure	Recovery
Control		0.043±0.007 ^{Aa}	0.043±0.007 ^{Aa}
[0.45]		0.065±0.005 ^{Ba}	0.050±0.005 ^{Bb}
[0.91]		0.083±0.007 ^{Ba}	0.055±0.005 ^{Bb}
Ascorbic acid		Exposure	Recovery
Control		4.54±0.37 ^{Aa}	4.54±0.37 ^{Aa}
[0.45]		6.19±0.63 ^{Ba}	5.50±0.52 ^{Bb}
[0.91]		6.05±0.43 ^{Ba}	5.46±0.59 ^{Bb}
Non-protein thiols		Exposure	Recovery
Control		0.73±0.04 ^{Aa}	0.73±0.04 ^{Aa}
[0.45]		1.05±0.06 ^{Ba}	0.67±0.09 ^{Ab}
[0.91]		1.04±0.12 ^{Ba}	0.80±0.04 ^{Ab}

SOD: superoxide dismutase (UI SOD protein⁻¹); GST: glutathione S-transferase (μmol GS-DNB min/mg protein⁻¹); CAT: catalase (μmol mg protein⁻¹ min⁻¹); Ascorbic acid (μmol ASA g tissue⁻¹); Non-protein thiols (μmol SH-g tissue⁻¹). Data are reported as mean ± standard deviation (n = 8). Different capital letters indicate significant difference among exposure concentrations (column) and different lowercase letters indicate difference exposure and recovery periods (line) by the Tukey test (*P* < 0.05).

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, após oito dias de exposição aos herbicidas comerciais contendo glifosato e clomazone, observou-se um aumento nos níveis de TBARS no fígado e músculo de jundiás nas maiores concentrações. Sendo que no músculo de jundiás expostos ao clomazone também foi observado aumento do TBARS na concentração de 0,45 mg/L. No cérebro os níveis de TBARS indicam diferentes resultados para os herbicidas. *R. quelen* quando expostos ao glifosato mostram aumento do TBARS nas concentrações de 0,45 e 0,95 mg/L, enquanto que os expostos ao clomazone não foram observadas alterações em nenhuma das concentrações usadas. O aumento nos níveis de TBARS é um indicativo de estresse oxidativo. Os resultados obtidos em nosso estudo mostram similaridades com os de Crestani *et al.* (2007) que observaram aumento do TBARS em fígado de *R. quelen* após 12, 24, 48, 96 e 192 horas de exposição ao herbicida clomazone. Gluszczak *et al.* (2007) também encontraram níveis elevados de TBARS em músculo de jundiás expostos ao herbicida glifosato. Alterações nos níveis de TBARS no cérebro ocorreram somente nos peixes expostos ao glifosato. Oruç *et al.* (2004) observaram alterações neste parâmetro em cérebro e rim de *Oreochromis niloticus* expostos ao 2,4-D após 96 hs. Herbicidas como o glifosato e o clomazone podem induzir estresse oxidativo levando a geração de radicais livres e à peroxidação lipídica como um mecanismo envolvido na toxicidade destes compostos. A peroxidação lipídica pode ser devido a um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e pró-oxidante gerada pela toxicidade dos herbicidas. Entretanto, as alterações observadas nos tecidos dos jundiás foram transitórias com relação à peroxidação lipídica porque quando os peixes foram transferidos para água sem o herbicida por oito dias, os níveis de TBARS retornaram aos valores do grupo controle para ambos os herbicidas usados. Nossos resultados estão de acordo com Crestani *et al.* (2007) que observaram recuperação nos níveis de TBARS em fígado de *R. quelen* em água sem o herbicida clomazone após 96 e 192 horas. Miron *et al.* (2008) também observaram a recuperação do TBARS em fígado de *Leporinus obtusidens* em água livre do herbicida clomazone após 192 horas.

Os níveis de proteína carbonil foram aumentados em resposta à exposição aos herbicidas glifosato e clomazone no tecido hepático dos jundiás em ambas as

concentrações usadas quando comparados com seus respectivos controles. O aumento nos níveis da proteína carbonil pode indicar que o metabolismo protéico normal foi alterado, resultando em acumulação de moléculas com danos (PARVEZ *et al.*, 2006). Nossos resultados estão de acordo com Parvez & Raisuddin (2005) que verificaram um significativo aumento no conteúdo de proteína carbonil em brânquias, rim e fígado de *Channa punctata* (Bloch) após 48 horas de exposição ao deltametrin, endosulfan e paraquat. Quando os peixes foram transferidos para água livre dos herbicidas os níveis de proteína carbonil retornaram aos valores próximos do grupo controle para os dois herbicidas testados. Miron *et al.* (2008) observaram aumento da proteína carbonil no fígado de piavas expostas ao herbicida clomazone na concentração de 0,5 mg/L após 96 e 192 horas, sendo que este aumento persistiu após período de recuperação de 192 horas. O estresse oxidativo foi gerado pela exposição ao glifosato e clomazone devido ao aumento nos níveis de TBARS e proteína carbonil, entretanto esse fenômeno não persistiu quando os peixes foram transferidos para água livre dos herbicidas, indicando um curto tempo de toxicidade causada por esses herbicidas.

As variações na atividade de enzimas antioxidantes têm sido utilizadas como indicadores de estresse oxidativo mediado por poluentes (AHMAD *et al.*, 2000; SAYEED *et al.*, 2003; ORUÇ, 2009). Neste estudo não foram observadas alterações na atividade da catalase quando os jundiás foram expostos ao glifosato e ao clomazone a ambas as concentrações usadas. A carbonilação de proteínas devido a ação direta das EROs pode causar perda da atividade da enzima e alguns produtos da peroxidação lipídica podem reagir com resíduos de aminoácidos, alterando a função da enzima. Portanto, muitas enzimas envolvidas nos processos de defesa antioxidantes podem ser inativadas pelo excesso de oxidantes (MORAES *et al.*, 2007; MODESTO & MARTINEZ, 2010). A manutenção da atividade da catalase neste estudo, após oito dias de exposição aos dois herbicidas, está de acordo com Modesto & Martinez (2010), que não observaram alterações na catalase do fígado de *Prochilodus lineatus* após exposição de 6, 24 e 96 horas ao Roundup®. Gluszczak *et al.* (2007), também não observaram alterações na atividade desta enzima no fígado de *R. quelen* expostos a 0,2 e 0,4 mg/L de Roundup® após 96 horas. No período de recuperação, continuou sem alterações a atividade da catalase no fígado dos peixes expostos ao glifosato, enquanto que os jundiás expostos ao clomazone quando colocados em água sem o herbicida mostraram um aumento significativo na

atividade da catalase. Este resultado sugere possível dano oxidativo ao fígado. O aumento da atividade no período de recuperação provavelmente indica que um mecanismo regulatório deste antioxidante ajuda a destoxificar o herbicida. Geralmente, a atividade da catalase não é considerada um biomarcador em estudos toxicológicos, porque inibição, indução ou não alteração são observadas após exposição a vários contaminantes (SAYEDD *et al.*, 2003; SEVGILER *et al.*, 2004; CRESTANI *et al.*, 2007; GLUSCZAK *et al.*, 2007; ORUÇ, 2009).

A atividade da SOD mostrou uma elevação em fígado de *R. quelen* apenas quando expostos a concentração 0,91 mg/L do herbicida clomazone, pelo contrário quando expostos ao glifosato não foram observadas alterações em nenhuma das concentrações usadas. Mecanismos de defesas antioxidantes, incluindo a SOD, têm considerável importância para os peixes, porque induz proteção contra a produção de radicais livres produzidos devido ao estresse oxidativo (CHEUNG *et al.*, 2001; ORUÇ, 2009). O aumento da atividade da SOD pode estar relacionado com o estresse oxidativo causado pela exposição ao clomazone e sua elevação ocorre na tentativa de neutralizar o impacto das EROs. Monteiro *et al.* (2006) verificaram aumento da atividade da SOD em fígado de *Brycon cephalus* após 96 horas de exposição ao Folisuper 600[®]. Com relação à exposição dos peixes ao glifosato, não foram observadas alterações na SOD e catalase, indicando que estas defesas não foram suficientes para combater o estresse oxidativo gerado pelo aumento dos níveis de TBARS e proteína carbonil. Nossos resultados estão de acordo com Sevgiler *et al.* (2004) que não observaram alterações na atividade da SOD e CAT em *Oreochromis niloticus* após exposição ao etoxazole. Após o período de recuperação de oito dias, os peixes expostos ao clomazone que apresentaram aumento na atividade da SOD (0,91 mg/L) retornaram aos valores próximos ao do grupo controle, enquanto que jundiás expostos ao glifosato não apresentaram alterações durante a exposição. Após período em água sem o herbicida foi observado uma diminuição na atividade da SOD na concentração de 0,95 mg/L, indicando possivelmente uma baixa toxicidade quando em exposição de curto prazo.

A GST tem função importante na proteção dos tecidos contra os efeitos de xenobióticos (MONTEIRO *et al.*, 2006; FERRARI *et al.*, 2007). Os efeitos dos poluentes com relação à atividade desta enzima tem sido inconclusivos, pois mostram indução, não alteração ou inibição (BALLESTEROS *et al.*, 2009). Nosso estudo confirma esta afirmação, pois o fígado dos peixes expostos ao glifosato

mostrou diminuição da GST em ambas às concentrações usadas e quando expostos ao clomazone foi observado aumento da GST. A diminuição da atividade da enzima é pouco conhecida e pode sugerir uma falha na destoxificação e ocorrência do estresse oxidativo (BALLESTEROS *et al.*, 2009). Ballesteros *et al.* (2009) observaram diminuição da atividade da GST em brânquias, fígado e músculo de *Jenynsia multidentata* expostos ao endosulfan. O aumento da GST ocorre provavelmente devido ao aumento no processo de biotransformação dos xenobióticos pelos peixes expostos ao clomazone e/ou proteção contra a toxicidade do herbicida que leva a peroxidação lipídica (ORUÇ *et al.*, 2004; ORUÇ, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010). Modesto & Martinez (2010) observaram aumento na atividade da GST em fígado de *Prochilodus lineatus* após 24 e 96 horas de exposição ao Roundup[®]. Após o período de recuperação, a atividade da GST em fígado aumentou para ambos os herbicidas. Este aumento pode indicar o desenvolvimento de um mecanismo de defesa para neutralizar os efeitos dos herbicidas e pode refletir a possibilidade de uma proteção mais eficiente contra a toxicidade destes compostos. O estresse oxidativo depende da intensidade e duração do estresse aplicado, bem como da suscetibilidade da espécie ao composto exposto em que pode levar ao aumento ou inibição de enzimas antioxidantes (ORUÇ, 2009).

Tem sido observado que quando as defesas antioxidantes enzimáticas estão alteradas, defesas secundárias, tais como o ácido ascórbico, podem prevenir reações de auto-oxidação e neutralizar diretamente as EROs (SAYEED *et al.*, 2003). *R. quelen*, quando expostos ao glifosato, não mostraram alterações significativas nos níveis de ácido ascórbico do tecido hepático após exposição e período de recuperação. Este resultado sugere que este antioxidante não foi utilizado para neutralizar as EROs. Parvez *et al.* (2006) também não observaram alterações nos níveis de ácido ascórbico em tecidos de *Wallago attu* após um acidente ambiental em Panipat, Índia. Ao contrário, peixes expostos ao clomazone mostraram aumento nos níveis de ácido ascórbico em ambas as concentrações usadas e este aumento persistiu após o período de recuperação. Sayeed *et al.* (2003) observaram aumento nos níveis de ácido ascórbico em rim e fígado de *Channa punctatus* expostos ao deltametrin. O aumento do ácido ascórbico observado após a exposição ao clomazone pode ter efeito sobre a resistência ao estresse oxidativo.

Outro antioxidante não enzimático avaliado em nosso estudo foram os tióis não protéicos, que têm sido usados como biomarcador de exposição em ambientes aquáticos (PARVEZ & RAISUSUDIN, 2006; SAYEED *et al.*, 2003). Os tióis possuem papel na proteção contra o estresse oxidativo. Esta observação pode ser atribuída ao fato de que a adaptação celular ao estresse oxidativo pode envolver a mobilização de mecanismos que alteram as concentrações de tióis (PARVEZ & RAISUSUDIN, 2006). Os peixes expostos ao glifosato mostraram redução significativa neste parâmetro no tecido hepático quando expostos a concentração de 0,95 mg/L, porém valores próximos ao do controle foram observados após período de recuperação. A diminuição nos tióis observada após exposição ao glifosato pode predispor a célula ao dano oxidativo. Já quando expostos ao clomazone houve um aumento nos níveis de tióis nas duas concentrações usadas e este aumento persistiu após período de recuperação. Parvez *et al.* (2006) observaram significativo aumento nos níveis de tióis não protéicos no fígado de *Wallago attu* após um acidente ambiental na localidade de Panipat. O aumento dos tióis não protéicos observado pode representar uma proteção contra o estresse oxidativo induzido pela toxicidade do herbicida. As defesas antioxidantes não-enzimáticas avaliadas neste estudo parecem fundamentais para o processo de detoxificação dos herbicidas glifosato e clomazone.

Neste trabalho, foi avaliado o perfil oxidativo em tecidos de jundiás expostos aos herbicidas glifosato e clomazone e pelos resultados obtidos pode-se sugerir que em curto período de tempo esses herbicidas são capazes de induzir estresse oxidativo nestes peixes, sendo essas alterações transitórias e reversíveis.

6 CONCLUSÕES

- O aumento nos níveis do TBARS em diferentes tecidos dos jundiás e nos níveis de carbonilação de proteínas, no fígado deste peixe, evidenciou uma situação de estresse oxidativo para ambos os herbicidas usados neste estudo;
- Não foram observadas alterações na atividade da catalase quando os jundiás foram expostos ao glifosato e ao clomazone, isto pode ter ocorrido devido ao excesso de oxidantes que pode ter levado a não resposta desta enzima;
- A atividade da SOD mostrou-se elevada apenas no tecido hepático dos jundiás expostos a maior concentração do clomazone, não mostrando alteração quando expostos ao glifosato. O aumento pode estar relacionado com a tentativa de neutralizar as EROs;
- A atividade da GST apresentou-se diminuída no fígado dos peixes expostos ao glifosato e aumentada quando expostos ao clomazone. A diminuição sugere uma exaustão da enzima e ocorrência do estresse oxidativo. Enquanto que o aumento pode indicar o desenvolvimento de um mecanismo de defesa para neutralizar o efeito do herbicida;
- Os jundiás expostos ao glifosato não mostraram alterações nos níveis de ácido ascórbico, indicando que este antioxidante pode não ter sido utilizado para neutralizar as EROs. Quando expostos ao clomazone foi observado aumento do ácido ascórbico, o que pode contribuir para combater o estresse oxidativo gerado pelo herbicida;
- A redução nos tióis observada após exposição ao glifosato pode predispor a célula ao dano oxidativo. Por outro lado, o aumento dos tióis não protéicos observado após exposição ao clomazone pode representar uma proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo herbicida.

- A maioria das desordens observadas durante a exposição aos herbicidas não persistiram após o período de recuperação, mostrando que as alterações são de moderada intensidade e reversíveis;
- A formulação comercial contendo glifosato altera apenas alguns parâmetros toxicológicos dos jundiás, indicando que uma exposição em curto prazo pode afetar apenas temporariamente a saúde do peixe. E este resultado também pode estar relacionado à baixa toxicidade deste herbicida;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 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.

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 10, p.153-158, 2001.

BALLESTEROS, M.L.; WUNDERLIN, D.A.; BISTONI, M.A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 72, p.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 Part C**, v. 140, p. 175-186, 2005.

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOHL, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITZÉS, I.; KRIEGER, M. H.; LULHIER, F. Steroid Profiles in Cultured Female Jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the First Reproductive Cycle. **Gen Comp Endocrinol**, v. 121, p. 325-332, 2001.

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

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

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environ Health Perspect**, v. 114, p. 1803-806, 2006.

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 71, n. 9, p. 725-731, 1993.

CHEUNG, C.C.; ZHENG, G.J.; LI, A.M.Y.; RICHARDSON, B.J.; LAM, P.K.S. Between tissue concentrations of polycyclicaromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels (*Perna viridis*). **Aquatic Toxicol**, v. 52, p.189-203, 2001.

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

DAVIES, K.J.A. An overview of oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 50, p. 241-244, 2000.

FERRARI, A.; VENTURINO, A.M.; D'ANGELO, P. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pest Biochem Physiol**, v. 88, p. 134-142, 2007.

FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIerno, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 69, n. 3, p. 416-420, 2008.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J.; CHIPARI-GOMES, A. R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Cienc Rural**, v. 30, n. 1, p. 79-185, 2000.

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

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

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3. ed. **NY: Oxford University Press**, 1999, p. 936.

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

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

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

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v. 76, p. 932-937, 2009.

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

MASELLA, R., DI BENEDETTO, R., 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.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

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

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

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

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

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.

OROPESA, A.L.; CAMBERO, J.P.G.; SOLER, F. Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). **Environ Toxicol.**, v. 23, p. 285-293, 2009.

ORUÇ, E. Ö. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. **Pest Biochem Physiol**, v. 96, p. 160-166, 2010.

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

ORUÇ, E. Ö., SEVGILER, Y., ÜNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp Biochem Physiol Part 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.
- PARVEZ, S.; PANDEY, S.; ALI, M.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress in *Wallago attu* (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. **Sci Total Environ**, v. 368, p.627-636, 2006.
- 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.
- PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to deltamethrin. **Chemosphere**, v.62, p.1324-1332, 2006.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de Herbicidas**, 5^a ed. Londrina: IAPAR, 2005, 648p.
- SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; RIZWANUL, H.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 56, p. 295-301, 2003.
- SENSEMAN, S.A. **Herbicide Handbook**. Weed Science Society of America, Ninth Edition, 2007, 458p.
- SEVGILER, Y.; PINER, P.; DURMAZ, H.; ÜNER, N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio*. **Pest Biochem Physiol**, v. 87, p. 248-254, 2007.
- SIES, H. Strategies of antioxidants defenses. **Eur J Biochem**, v. 215, p. 213-219, 1993.
- STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Curr Med Chem**, v. 11, p. 1105–1112, 2004.
- TORRES, B. B. **Nutrição e esporte uma abordagem bioquímica**. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2003.

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.

WANG, X ; KIM, K.W.; BAI, S.C. ; HUH, M.D. ; CHO, B.Y. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture**, v.215, p. 203-211, 2003.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E.G.; GONÇALVES, F.F.; MARTINS, A.F. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **J Chromatogr A**, v. 904, p. 257-262, 2000.

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