



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

**PARÂMETROS METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS
DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS À
FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA
2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Roberta Cattaneo

Santa Maria-RS, Brasil

2009

**PARÂMETROS METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS DE
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS À FORMULAÇÃO
COMERCIAL DO HERBICIDA
2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)**

Por

Roberta Cattaneo

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

Mestre em Bioquímica Toxicológica

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

Santa Maria-RS, Brasil

2009

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

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

**PARÂMETROS METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS DE JUNDIÁS
(*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS À FORMULAÇÃO COMERCIAL DO
HERBICIDA 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)**

elaborada por

Roberta Cattaneo

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 (UFSM)

Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)

Santa Maria, 08 de maio de 2009.

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, Luke, cunhadas, tias,
namorado e a todos que de alguma forma me auxiliaram nesta
caminhada.*

*Obrigada por todo o apoio e incentivo;
Pois, certamente este trabalho é o resultado
do amor, do carinho, da dedicação e
da experiência de vida que me foi passado por todos vocês.
Amo muito vocês!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha vida e por todas as oportunidades que me proporcionaste em toda a minha vida

Aos meus pais pela vida, pela dedicação, pelo carinho, incentivo, compreensão e pelos ensinamentos que foram repassados, amo muito vocês

Aos meus irmãos, cunhadas e afilhado que sempre estiveram do meu lado, me apoiando em minhas escolhas, amo vocês, obrigada pelo carinho

A meu namorado que me apóia em minhas conquistas e agora na finaleira foi extremamente compreensivo e paciente com minha grande ansiedade

A minha orientadora, professora Vanía Lucia Loro, pela oportunidade que me destes, por todos os ensinamentos, por toda a paciência, confiança, dedicação e amizade. Obrigada por tudo que tenho conquistado desde que te conheci, você é responsável por grande parte de TODAS essas conquistas

Ao meu co-orientador (não oficialmente, mas de coração), professor Luís Antonio de Avila, por suas idéias e a sua imensa disponibilidade em me ajudar, ensinar e guiar. Muito obrigada por sua amizade e compreensão sempre

A minha melhor amiga e IRMÃ, Bárbara que foi meu porto seguro nessa caminhada, me auxiliando em todos os momentos. Obrigada por sua disponibilidade em me ajudar, SEMPRE. Por compartilhar TODOS os momentos durante todos esses anos. Por sua amizade, seus conselhos, seu apoio e sua companhia que foram importantíssimos nesse período da minha vida

A colega e amiga Rita, que foi minha “abre alas” no laboratório 2238, obrigada pela confiança e pela ajuda desde o meu primeiro dia que vim a Santa Maria

À Bibiana, Adriana, Charlene, Cândida e Aracéli, amigas queridas que estiveram sempre presentes com suas experiências, seus conselhos sinceros, seus carinhos, seus sorrisos, enfim suas amizades

A Alexandra, minha colega e amiga do laboratório, por sua generosidade, disponibilidade, sua tranquilidade e sua enorme contribuição neste trabalho

A colega e amiga Milene pelo seu companheirismo sua alegria contagiante e principalmente pela sua fundamental

contribuição por neste trabalho, sem você certamente este trabalho não existiria

As estagiárias e amigas Jossiele e Thaís pelo companheirismo e auxílio prestado

A colega e amiga Denise, por todos os ensinamentos

Aos professores do curso pelos ensinamentos

Aos professores componentes da banca examinadora desta dissertação pela disponibilidade para a participação dessa defesa

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica que me proporcionaram tudo que foi necessário para a realização desse trabalho

A Capes, pela bolsa concedida

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

RESUMO

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

PARÂMETROS METABÓLICOS E HISTOLÓGICOS DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS À FORMULAÇÃO COMERCIAL DO HERBICIDA 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

AUTORA: ROBERTA CATTANEO
ORIENTADORA: VANIA LUCIA LORO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 08 de maio de 2009.
Prédio 18, sala 2026 - UFSM

2,4-diamin (2,4-D), ou ácido 2,4 diclorofenoxiacético é um herbicida sistêmico amplamente utilizado no mundo para controle de plantas daninhas broadleaf. Agroquímicos de diversas classes são considerados essenciais para o desenvolvimento agrícola, mas podem afetar os ecossistemas através da contaminação ambiental do solo e da água, devido. A presença de herbicidas no sistema aquático pode contaminar os peixes e, conseqüentemente, outros animais, que se alimentam de peixes, causando indiretamente uma maior contaminação. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da formulação comercial do herbicida 2,4-D nas concentrações de 400, 600 e 700 mg L⁻¹ sobre parâmetros metabólicos, atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e avaliação histológica do fígado de jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos por um período de 96 h. Como resultados observamos que a atividade da AChE mostrou-se aumentada no cérebro (600 e 700 mg L⁻¹) e diminuída no tecido muscular em todas as concentrações testadas. O glicogênio hepático foi reduzido, após exposição ao 2,4-D variando entre 47,7% (400 mg L⁻¹) e 59,3% (700 mg L⁻¹). Já no tecido hepático houve reduções do lactato em todas as concentrações testadas e da glicose apenas na concentração de 700 mg L⁻¹ 2,4-D. Na maior concentração testada o glicogênio hepático e a glicose apareceram reduzidos, ao contrário da glicose plasmática que estava com níveis aumentados. O glicogênio do tecido muscular mostrou-se reduzido nos alevinos expostos a todas as concentrações testadas do herbicida e na concentração de 700 mg L⁻¹ houve redução da glicose. O lactato muscular aumentou em todas as concentrações de 2,4-D testadas. Foi observada vacuolização de hepatócitos e alterações no arranjo dos cordões hepáticos através da análise histológica no grupo tratado com 700 mg L⁻¹ 2,4-D. Estes resultados sugerem que os jundiás expostos a concentrações de 2,4-D perto da CL₅₀ mostraram resposta metabólica e histológica compensatória ao estresse causado pelo herbicida. Assim, este conjunto de parâmetros medidos pode ser utilizado como biomarcador para acompanhar a possível contaminação dos peixes pelo herbicida 2,4-D.

Palavras-chave: 2,4-D; herbicida; histologia; resposta metabólica; jundiá; AChE.

ABSTRACT

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

METABOLIC AND HISTOLOGICAL PARAMETERS OF SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) EXPOSED TO COMMERCIAL FORMULATION OF 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID (2,4-D) HERBICIDE

AUTHOR: ROBERTA CATTANEO

ADVISOR: VANIA LUCIA LORO

Data and Place of the defense: May, 08th, 2009, Santa Maria.

Building 18, Room 2026 - UFSM

2,4-Diamin (2,4-D), or 2,4 dichlorophenoxyacetic acid is a systemic herbicide widely used in the world to control of broadleaf weeds. Agrochemicals of various classes are considered essential to agricultural development, but owing to toxic effects some of them can affect ecosystems through environmental contamination of soil and water. The presence of herbicides in aquatic system can contaminate fish and consequently, others animals, which feed on fish, causing indirectly contamination. Thus, the objective of this study was to investigate the effects of commercial formulation of herbicide 2,4-D concentrations of 400, 600 and 700 mg L⁻¹, on metabolic parameters, acetylcholinesterase (AChE) activity and liver histological evaluation of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed for 96 h. AChE activity increased in brain (600 and 700 mg L⁻¹) and decreased in all concentrations tested in muscle tissue. Hepatic glycogen was reduced after 2,4-D exposure ranging from 47.7% (400 mg L⁻¹) and 59.3% (700 mg L⁻¹). Hepatic tissue showed lactate reduction at all 2,4-D concentrations tested and glucose was reduced only at 700 mg L⁻¹. In the highest concentration tested hepatic glycogen, glucose reduced and plasma glucose levels increased. White muscle tissue showed glycogen reduction in fingerlings exposed to all herbicide concentrations and glucose reduction at 700 mg L⁻¹. Muscle lactate levels increase at all 2,4-D concentrations tested. Vacuolation of hepatocytes and changes in their arrangement cords were observed by histologic al analysis in the group treated with 700 mg L⁻¹ 2,4-D. These results suggest that silver catfish exposed to 2,4-D concentrations near CL₅₀ showed metabolic and histological responses to compensate some stress caused by herbicide exposure. Taken together parameters measured can be used as biomarkers to monitor fish contaminating by 2,4-D.

Keywords: 2,4-D; herbicide; histology; metabolic response; silver catfish; AChE.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1 – Exemplar de jundiá (*Rhamdia quelen*) juvenil.....19
- FIGURA 2 – Reação catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE).....20

ARTIGO 1

FIGURE 1 - AChE activity in the brain (○) and muscle (●) of *Rhamdia quelen* exposed to 400, 600 and 700 mg/L of 2,4-D. AChE activities were expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ protein. Values significant different from control are indicated as $*P<0.01$ (n=10).....27

FIGURE 2 A– Liver of *Rhamdia quelen* of the control group showing normal hepatocytes. (Arrow). HE x 400. (n=10).....27

FIGURE 2 B – Liver of *Rhamdia quelen* after exposure to 700 mg/L of 2,4-D, showing abnormal cords arrangement and vacuolation of hepatocytes. (Arrow). HE x 400. (n=10).
.....27

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1. Metabolic parameters of plasma and tissues of *Rhamdia quelen* exposed at sub-lethal concentration of 2,4-D. *Indicate significant difference of control group (0) mg L⁻¹ (n=10).....27

TABELA 2. Lethal concentration and effects of different concentrations of 2,4-D (mg L⁻¹) on feeding behavior, activity and brain muscle AChE activity (% of control) in silver catfish fingerlings. 100% activity = 0.02 or 0.01 μmol of acetylthiocholine min⁻¹ per g⁻¹ of protein, respectively, for brain and muscle.....27

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

BChE: butirilcolinesterase

CL₅₀: Concentração letal média

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
APRESENTAÇÃO.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Contaminação ambiental.....	15
3.2 Herbicida 2,4-D.....	16
3.2.1 Toxicidade do herbicida 2,4-Diamin	17
3.3 Jundiá(<i>Rhamdia quelen</i>).....	18
3.4 Enzima Acetilcolinesterase (AChE).....	19
3.5 Metabólitos intermediários.....	21
3.6 Estudo Histológico.....	22
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Artigo: Metabolic and histological parameters of silver catfish (<i>Rhamdia quelen</i>) exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., Silveira, F.A, Luz, L., Miron, D.S., Fonseca, M. B, Moraes, B. Clasen, B.....	24
5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

APRESENTAÇÃO

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

A seguir, os **RESULTADOS** são apresentados na forma de **MANUSCRITOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam a 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

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

Entre os herbicidas utilizados nas culturas agrícolas do RS, o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é bastante utilizado devido ao seu baixo custo e boa seletividade. Este herbicida é pouco biodegradável e frequentemente detectado nos cursos de água desta região (PRIMEL *et al.*, 2005). Concentrações entre 0,5 a 1,1 mg L⁻¹ são as indicadas para o uso deste produto na região Sul do Brasil (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). De acordo com GALLAGHER & DI GIULIO, (1991), o herbicida 2,4-D em baixas concentrações pode ser considerado pouco tóxico para peixes. Porém, estudos recentes com a espécie nativa do RS *Leporinus obtusidens* mostram que o peixe pode reter até 30% deste composto (FONSECA *et al.*, 2008).

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

A presença de herbicidas na água pode causar alterações fisiológicas em peixes, as quais podem ser avaliadas através dos parâmetros metabólicos, tais como níveis de lactato, glicose e glicogênio em diferentes tecidos (SANCHO *et al.*, 1998; JYOTI & NARAIAN, 1999). Alterações metabólicas no tecido hepático são frequentemente

encontradas em peixes expostos a diferentes componentes tóxicos encontrados na água, já que o fígado é o órgão central responsável pela destoxificação do organismo (ORUÇ & ÜNER, 1999; CRESTANI *et al.*; 2006). Como o fígado é um órgão essencial para o metabolismo e excreção de substâncias tóxicas nos peixes, a análise histológica parece ser um parâmetro crucial na determinação de mudanças celulares que pode ocorrer em órgãos-alvo, tais como o fígado (CRESTANI *et al.*, 2007).

A medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE; CE 3.1.1.7) é um dos indicadores utilizados para verificar efeitos de organofosforados e carbamatos (CHUIKO, 2000, AGUIAR *et al.*, 2004), e de outros pesticidas como o 2,4-D, como demonstrado por SARIKAYA *et al.* (2003), que observaram mudanças de comportamento em *Cyprinus carpio L.* expostos a diferentes concentrações deste herbicida, incluindo distúrbios na natação e dificuldades respiratórias.

Tendo em vista que a contaminação ambiental pelo uso de agrotóxicos é um fato, tornam-se necessárias avaliações toxicológicas de pesticidas utilizados na agricultura em organismos não-alvo, como os peixes, uma vez que muitos são consumidos diretamente após despesca. Sendo assim, os objetivos do nosso trabalho foram os seguintes:

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do herbicida 2,4-D em alguns parâmetros do metabolismo de carboidratos, verificar se a atividade da enzima acetilcolinesterase sofreu alterações significativas, bem como analisar se os parâmetros histológicos apresentaram alguma (as) mudança (as) no fígado de *Rhamdia quelen* após exposição aguda.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Calcular a CL_{50} dos jundiás em 96 horas de exposição ao herbicida 2,4-D
- ✓ Verificar a glicemia dos peixes após exposição de 96 horas ao herbicida 2,4-D
- ✓ Avaliar os intermediários metabólicos (glicogênio, glicose, lactato) em músculo e fígado de *Rhamdia quelen* após exposição aguda ao herbicida 2,4-D
- ✓ Analisar a atividade da enzima AChE em cérebro e músculo de jundiás após as exposições ao herbicida
- ✓ Analisar parâmetros histológicos (vacuolização e ruptura de membrana dos hepatócitos, como também o arranjo dos cordões hepáticos) em fígado de *Rhamdia quelen* após exposição aguda ao herbicida 2,4-D

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminação ambiental

As práticas agrícolas estão diretamente relacionadas com o uso de pesticidas, a fim de controlar as pragas que atacam os produtos cultivados na agricultura, aumentando a produtividade. Entretanto, o uso contínuo destes produtos pode ser tóxico, podendo até mesmo ser mutagênico e cancerígeno (PRIMEL *et al.*, 2005). O uso indiscriminado de pesticidas na agricultura é uma grande causa de envenenamento no mundo. Cerca de três milhões de casos de envenenamento severo são registrados e destes, duzentos e vinte mil culminam com a morte. Segundo o centro de informações toxicológicas do Rio Grande do Sul (CIT-RS), foram registrados no ano de 2003: 1.193 atendimentos de casos possíveis de intoxicação de agrotóxicos no uso agrícola e 578 atendimentos de possíveis intoxicações por agrotóxicos no uso doméstico (<http://www.cit.rs.gov.br> acesso dia 07 de maio de 2009).

A contaminação dos ambientes aquáticos por estes pesticidas oriundos das práticas agrícolas se tornou um problema de grande importância mundial. Atualmente, muitos estudos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar alterações causadas por estes xenobióticos em organismos aquáticos (SANCHO *et al.*, 2000). Existem duas maneiras principais através das quais os pesticidas podem se concentrar no ambiente aquático: sua persistência no solo que ao ser lixiviado libera-os para os cursos de água, e também através de sua evaporação para a atmosfera chegando até esses meios por precipitação (PAN & DUTTA, 1998). Além da possibilidade de contaminação dos cursos de água naturais, temos os sistemas de criação de peixes, prática muito empregada na região Sul da América do Sul. Grande parte dos criadouros localiza-se próximo ou dentro de áreas de plantações agrícolas, mantendo assim, um contato direto dos animais com os produtos químicos utilizados nas lavouras (SOSO *et al.*, 2007). Esses tóxicos causam alterações na composição química dos ambientes aquáticos, o que pode causar sérios prejuízos à fauna natural (ORUÇ & UNER, 2004; ADHIKARI *et al.*, 2004). Assim, a presença contínua de componentes tóxicos nas águas pode causar alterações diversas em peixes, inclusive no comportamento reprodutivo, podendo

chegar até mesmo à mortalidade destes indivíduos. Um efeito a longo prazo pode culminar, inclusive, com a extinção de espécies mais susceptíveis a esse tipo de variação ambiental (SOSO *et al.*, 2007).

3.2 Herbicida 2,4-D

O 2,4-diamin (2,4-D), sal dimetilamina do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, por ser um herbicida de baixo custo e que possui uma boa seletividade, é amplamente utilizado na região Sul do Brasil no controle de algumas plantas daninhas que infestam as plantações agrícolas. A concentração indicada para o uso do herbicida 2,4-D nas plantações da região Sul está entre 0,5 e 1,1 mg L⁻¹, segundo RODRIGUES & ALMEIDA (2005). De acordo com PRIMEL *et al.* (2005) este herbicida possui uma meia vida de 7 e 7,5 dias em solo e água, respectivamente, uma solubilidade de 311 mg L⁻¹, um baixo potencial de contaminação de águas da superfície e um potencial intermediário na contaminação de águas subterrâneas na região Sul do Brasil. Os herbicidas clorofenoxiacéticos, como o 2,4-D, são utilizados para matar plantas daninhas por suas propriedades químicas que os torna semelhantes à auxina, o hormônio do crescimento das plantas, realizando uma superestimulação do crescimento que irá culminar com a sua morte (ORUÇ *et al.*, 2004; BENLI *et al.*, 2007). A toxicidade do herbicida 2,4-D em peixes depende da formulação utilizada, algumas fórmulas são extremamente tóxicas enquanto outras causam um prejuízo menor aos organismos expostos (SARIKAYA & SELVI, 2005). A formulação comercial do 2,4-D (sal dimetilamina do ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é composta por 72% (720 g L⁻¹) do equivalente em ácido e 86,8% do sal dimetilamina, (BASF, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), registrado sob o número 04118189, Chemical Abstract Service 94-75-7.

3.2.1 Toxicidade do herbicida 2,4-Diamin em peixes

A toxicidade aguda do herbicida 2,4-D é relatada por diversos autores, dentre eles SARIKAYA & SELVI (2005) obtiveram valores de CL_{50} 28,23 e 86,90 $mg L^{-1}$, respectivamente para larvas e adultos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em 48 horas. *Astacus leptodactylus* mostrou ser uma espécie muito sensível a este herbicida já que o valor de LC_{50} após 96 horas foi de 32,6 $mg L^{-1}$ (BENLI *et al.*, 2007). O nosso grupo de estudos encontrou um valor para CL_{50} de jundiás em 96 horas de 745 $mg L^{-1}$ (CATTANEO *et al.*, 2008). O herbicida 2,4-D é conhecido por causar alterações no sistema nervoso central, inibindo a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), (BENLI *et al.*, 2007). Um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que o herbicida 2,4-D altera alguns parâmetros bioquímicos, como intermediários metabólicos nos tecidos, e inibe a atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro e músculo de *Leporinus obtusidens*. Os peixes foram expostos por 96 horas às concentrações subletais (1,0 ou 10,0 $mg L^{-1}$) da formulação comercial do herbicida (FONSECA *et al.*, 2008). Em eritrócitos humanos, um decréscimo na atividade da acetilcolinesterase (determinada *in vitro*) esteve relacionado ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (BUKOWSKA *et al.*, 2006). ORUÇ *et al.* (2004) relataram que a exposição aguda (96 h) ao herbicida 2,4-D leva a uma situação de estresse oxidativo em carpas (*Cyprinus carpio*), com aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, além disso, esse efeito pode ser potencializado quando a exposição ao herbicida é combinada com o inseticida azinfos-metil. Em tilápias (*Oreochromis niloticus*) a mesma combinação e efeito individual destes pesticidas se mostrou bastante tóxica alterando a atividade do sistema antioxidante dos peixes expostos durante 24, 48, 72 e 96 h (ORUÇ & ÜNER, 2000). Outro efeito conhecido do herbicida 2,4-D é a alteração em parâmetros do metabolismo de carboidratos e proteínas em *Cyprinus carpio* expostos ao herbicida por 1, 2, 3, 4, 15 e 30 dias às concentrações subletais de 50 e 80 $mg L^{-1}$, conforme descrito por ORUÇ & ÜNER (1999).

3.3 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

Jundiá é o nome comum dado aos peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia*. Este gênero é classificado dentro da família Heptapteridae, ordem Siluriformes, série Teleostei e classe Osteichthyes (Figura 1). No Brasil o jundiá também é conhecido por jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca e na Argentina este peixe é conhecido como bagre, bagre-negro, bagre-sapo e bagre-sul-americano. O jundiá é encontrado do sudeste do México ao centro da Argentina (GOMES *et al.*, 2000).

O jundiá é um peixe de couro, cuja coloração varia de marrom-avermelhado claro a cinza, com a parte ventral do corpo mais clara. Ele pode variar a coloração do corpo de acordo com o ambiente que se encontra, pois quando colocado em ambientes claros, o jundiá tende a ficar mais claro e o inverso ocorre quando este peixe se encontra em um ambiente escuro. O jundiá apresenta barbilhões localizados junto à boca, que provavelmente possuem receptores de gosto para ajudar na localização do alimento e na percepção da qualidade da água (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004).

Nos primeiros anos de vida o jundiá tem um grande crescimento e este crescimento é maior em machos do que em fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida. Daí em diante as fêmeas passam a ter um crescimento mais rápido. Porém, em criação artificial observa-se um menor crescimento dos machos em função da precoce maturação sexual. O crescimento máximo das fêmeas pode chegar a 66,5 cm e dos machos aproximadamente 52,0 cm. As fêmeas também apresentam um maior tempo de vida, cerca de 21 anos, enquanto os machos podem teoricamente chegar a 11 anos (GOMES *et al.*, 2000).

O jundiá vive em lagos e poços fundos dos rios e tem preferência por ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, próximo às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos, de onde saem à noite para procurar alimento (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004). Uma acentuada aversão à luz e busca por locais escuros foi observada em experimentos realizados com larvas e alevinos desta espécie em cativeiro (PIAIA *et al.*, 1999). Exemplos adultos de *R. quelen* são

omnívoros com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (GUEDES, 1980; BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004).

O jundiá é uma espécie nativa adaptada a diferentes ambientes, pois apresenta bons resultados em relação à criação principalmente nas regiões mais frias. É uma espécie rústica, de rápido crescimento nos períodos mais quentes e suporta bem as baixas temperaturas ocorridas na região Sul do País. 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 industrial (BARCELLOS *et al.*, 2001; 2003).



Figura 1: Exemplar de jundiá (*Rhamdia quelen*).

3.4 Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

As colinesterases estão amplamente distribuídas entre os animais, desempenhando papéis importantes na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de funções como a hidrólise dos ésteres de colina e a destoxificação de xenobióticos (BRETAUD *et al.*, 2000; ROEX *et al.*, 2003). Existem duas famílias de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7), que hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a acetilcolina) e a

butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) que prefere hidrolisar outros tipos de ésteres como a butirilcolina (NIGG & KNAAK, 2000).

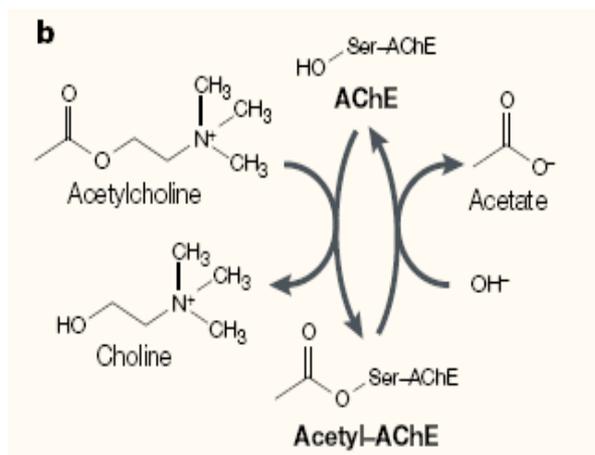


Figura 2: Reação catalisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) (adaptado de Soreq & Seidman, 2001).

A enzima acetilcolinesterase (Fig. 2) está presente no sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP) e também nos glóbulos vermelhos do sangue. Essa enzima é responsável por catalisar a degradação da acetilcolina em colina e acetato na fenda sináptica. A atividade da AChE pode variar de acordo com espécie de peixe. CHUIKO (2000) mostrou que o nível da atividade específica da acetilcolinesterase em cérebro de peixes da família Cyprinidae foi maior que os das famílias Percidae e Esocidae. A medida da atividade da enzima acetilcolinesterase é muito utilizada para avaliar a toxicidade de contaminantes ambientais em peixes. Esta enzima tem sido utilizada por diferentes autores como um marcador para diagnosticar a exposição a compostos como carbamatos e organofosforados (SANCHO *et al.*, 2000). Porém, em outros estudos, verificou-se que diferentes classes de agrotóxicos também causaram alterações na atividade da AChE em cérebro ou músculo de peixes (MIRON *et al.*, 2005; CRESTANI *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007). O efeito mais comum da exposição aos agrotóxicos é a inibição da atividade da acetilcolinesterase em peixes. A inibição de sua atividade resulta em estimulação excessiva dos nervos colinérgicos, que pode resultar em tremores, nado errático, convulsões e até mesmo a morte

(FÉRNANDEZ-VEGA *et al.*, 2002). DUTTA & ARENDS (2003), avaliando o inseticida endossulfan, encontraram uma significativa inibição da atividade da AChE em cérebro de *Lepomis macrochirus* quando expostos por até uma semana a concentração de $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ do produto. GLUSCZAK *et al.*, (2006), mostraram que a atividade da AChE foi inibida em cérebro de piavas (*Leporinus obtusidens*) quando estes peixes foram expostos a diferentes concentrações da formulação comercial do herbicida glifosato por um período de 96hs. Em um estudo realizado no campo (em lavoura de arroz irrigado) por um período de 30 dias de exposição, foi observada a inibição da enzima em cérebro de piavas após serem expostas às formulações comerciais dos herbicidas clomazone e quinclorac, já no músculo desses peixes houve um aumento da atividade da AChE após exposição ao clomazone, propanil e metasulfuron metil (MORAES *et al.*, 2007). Estudos recentes têm demonstrado que a atividade da AChE em tecidos de peixes pode variar de acordo com a espécie, com o tempo de exposição, com a condição experimental em que o peixe se encontra e com o tipo de tóxico a qual o peixe é exposto (MIRON *et al.*, 2005; CRESTANI *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007; GLUSCZAK *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008).

3.5 Parâmetros metabólitos

Os produtos tóxicos podem causar alterações biológicas em peixes que podem ser reconhecidas através da medida de alguns componentes do metabolismo (JYOTHI & NARAYAN, 1999). Os parâmetros metabólicos são bastante utilizados como indicadores gerais de estresse fisiológico em peixes (LERMEN *et al.*, 2004). Dentro desses parâmetros, podemos citar aqueles integrantes do metabolismo de carboidratos, como glicogênio, glicose e lactato, que podem estar alterados nos tecidos e no sangue dos peixes (BEGUM *et al.*, 1999). Também, é bastante utilizada a relação entre proteínas e os caminhos metabólicos dos carboidratos (AGUIAR *et al.*, 2004), já que muitas atividades teciduais são muito dependentes de proteínas por suas funções estruturais, catalíticas e regulatórias (GOTO *et al.*, 2004).

Muitos autores descrevem os efeitos tóxicos de pesticidas sobre parâmetros metabólicos em peixes. É conhecido que carpas (*Cyprinus carpio*) expostas ao herbicida 2,4-D nas concentrações subletais de 50 e 80 mg L⁻¹ sofrem alterações em alguns parâmetros do metabolismo de carboidratos em diferentes tecidos (ORUÇ & ÜNER, 1999). Os jundiás quando expostos ao herbicida clomazone à concentrações subletais apresentaram alterações em parâmetros como glicogênio e lactato em diferentes tecidos (CRESTANI *et al.*, 2006). NO fígado de piavas expostas por 96 horas ao glifosato apresentaram uma diminuição do lactato e da proteína e um aumento da glicose e do glicogênio, já no músculo houve uma diminuição desses carboidratos (GLUSCZAK *et al.*, 2006). FONSECA *et al.* (2008) demonstraram que Piavas expostas ao herbicida 2,4-D por 96 horas nas concentrações de 1,0 ou 10 mg L⁻¹ apresentaram modificações no padrão de alguns parâmetros do metabolismo, como glicose, lactato e glicogênio em diferentes tecidos.

3.6 Histologia

O fígado dos teleósteos é um órgão multifuncional responsável pela conversão do alimento, produção da vitelogenina durante o crescimento gonadal e desintoxicação de compostos estranhos (STEGEMAN & LECH, 1991). Alterações como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusóides e neoplasmas podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, desta forma, considerados como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (THOMAS, 1990; KÖHLER *et al.*, 1992; TEH *et al.* 1997). Estudando indicadores histopatológicos em peixes, SCHWAIGER *et al.* (1997) salientaram que as alterações histopatológicas mais severas observadas no fígado são mais freqüentes nos indivíduos de áreas contaminadas, mas que também ocorrem em indivíduos de áreas menos degradadas, só que em menor freqüência. Em um estudo com altas concentrações do herbicida Roundup® (205 a 410 mg de glifosato L⁻¹) observou-se efeito patogênico em carpas (*Cyprinus carpio*) confirmado por análise histológica, o qual levou à morte dos peixes em apenas uma hora de exposição (SZAREK *et al.*, 2000). POLEKSIC & KARAN (1999) observaram necrose nos

hepatócitos de carpas expostas ao herbicida trifluralin e expõem a importância de estudos histopatológicos, em conjunto a outros estudos, na medida de efeitos não letais de pesticidas em peixes. Já em outro estudo, onde foi realizada a análise histológica em jundiás (*Rhamdia quelen*) foi observada a vacuolização nos hepatócitos desses peixes, após 192 horas de exposição ao herbicida clomazone na concentração de 1,0 mg L⁻¹, e no período de recuperação de 192 horas, a vacuolização foi observada nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de clomazone (CRESTANI *et al.*, 2007). No entanto, trabalhos relacionados com histologia de peixes são escassos na literatura.

4 RESULTADOS:

4.1 Artigo

Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

Cattaneo, R.; Loro, V.L.; Spanevello, R.; Silveira, F.A.; Luz, L.; Miron, D.S.; Fonseca, M. B.; Moraes, B.; Clasen, B.

Publicado na revista *Pesticide Biochemistry and Physiology* 92 (2008), 133–137.



Contents lists available at ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ypest

Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide

R. Cattaneo^a, V.L. Loro^{a,*}, R. Spanevello^a, F.A. Silveira^b, L. Luz^b, D.S. Miron^a, M.B. Fonseca^a, B.S. Moraes^a, B. Clasen^a

^aLaboratório de Bioquímica Adaptativa, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900–Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 June 2007
Accepted 10 July 2008
Available online 17 July 2008

Keywords:
2,4-D
Histology
Metabolic response
Silver catfish
AChE

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of commercial formulation of herbicide 2,4-D on metabolic parameters, acetylcholinesterase (AChE) activity and liver histological evaluation of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed for 96 h. AChE activity increased in brain (600 and 700 mg L⁻¹) and decreased in all concentrations tested in muscle tissue. Hepatic glycogen was reduced after 2,4-D exposure ranging from 47.67% (400 mg L⁻¹) until 59.3% (700 mg L⁻¹). Hepatic tissue showed lactate reduction at all 2,4-D concentrations tested and glucose was reduced only at 700 mg L⁻¹. In the highest concentration tested hepatic glycogen and glucose reduced instead plasma glucose levels increased. White muscle tissue showed glycogen reduction in fingerlings exposed to all herbicide concentrations and glucose reduction at 700 mg L⁻¹. Muscle lactate levels increase at all 2,4-D concentrations tested. Vacuolation of hepatocytes and changes in its arrangement cords were observed by histologic analysis in group treated with 700 mg/L of 2,4-D. These results suggest that silver catfish exposed to concentrations of 2,4-D near of CL₅₀ showed metabolic and histological response to compensate some stress caused by herbicide exposure. Taken together parameters measured can be used as biomarkers to monitor herbicide contaminated water.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Herbicides of different chemical structure are widely used in agricultural practices. Agrochemicals of various classes are considered essential to agricultural development, but owing to toxic effects some of them can affect ecosystems through environmental contamination of soil and water [1]. The presence of herbicides in aquatic system can contaminate fish and consequently, others animals, which feed on fish, causing indirectly contamination [2]. In agriculture 2,4-D herbicide is used on cereal, grain crops and sugar cane to the broadleaf weed control [3]. It is used also in pasture, forest management, garden, and to control aquatic vegetation [4]. This herbicide generally has low solubility in water and showed to be contaminating underground water potential in the south of Brazil [5]. Commercial formulation containing 2,4-D herbicide is a strong acid, and forms water-soluble salts with alkali metals and amines, solubility (mg L⁻¹) in water is 23–180 (pH 7), 34–196 (pH 9) [6]. In waters of Southern Brazil 2,4-D has soil and water half-life around 7 and 7.5 days, respectively, and water solubility of

and 311 mg L⁻¹ [5]. The 2,4-D mechanism of action herbicide functions by maintaining high levels of the plant hormone auxin, resulting in overstimulation of plant growth and death. In addition is known that 2,4-D provokes changes in the animal nervous system due to interaction with acetylcholine, resulting sometimes inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity [2,4]. Decreased acetylcholinesterase activity of human erythrocytes (in vitro) due to indirect membrane modification and increased reactive oxygen species has been reported by Bukowska et al. [7].

Fish biological alterations caused by pesticides can be recognized by measurements of metabolic and enzymatic parameters which involve elements such as enzyme activity, modulation and physiological response [8]. Sarikaya et al. [2] observed behavioral changes in *Cyprinus carpio* L. exposed to different concentrations of 2,4-D including swimming disorders and breathing difficulties. Evaluation of acetylcholinesterase (AChE) activity is one of the indicators frequently used for diagnosis of organophosphate and carbamate exposure in fish [9]. Many studies have showed the effect of agrochemicals in AChE activity [9–14]. The inhibition of this enzyme by these compounds can affect locomotion and equilibrium in exposed organisms and also undesirable effects [15,12]. Recent works pointed out brain AChE inhibition by agrochemicals

* Corresponding author. Fax: +55 55 3220 8240.

E-mail addresses: vania@smail.ufsm.br, vaniluc@yahoo.com.br (V.L. Loro).

of another classes different of organophosphates and carbamates such as insecticide endosulfan [16] and commercial formulation of herbicide clomazone [12,14].

The silver catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptateridae), jundia was chosen for this experiment due to its economic and ecological importance. This species have a good growth from Southern Mexico to Central Argentina [17]. It is a suitable species for fish production in the southern part of South America [18]. Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of commercial formulation containing 2,4-D on some metabolic parameters as well as to verify if acetylcholinesterase activity and liver histological parameters presented some alterations in tissues of *Rhamdia quelen*.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

The commercial formulation (U46D-Fluid), (2,4-D acid equivalent 720 g L⁻¹ and dichlorophenoxyacetic dimethylamin salt of 2,4-D 868 g L⁻¹), Chemical Abstract Service (CAS 94-75-7), register number 04118189, BASF S.A., São Bernardo do Campo, SP, Brazil was used in experimentation. The concentrations used in experiments were chosen considering the concentrations obtained in LC₅₀-96 h. Acute toxicity assays were made in a static manner for 96 h.

2.2. Animals

Silver catfish (*Rhamdia quelen*) (9.1 ± 0.8 g and 8.5 ± 0.3 cm) were obtained from a local fish culture and transported to Laboratory, Universidade Federal de Santa Maria. The fingerlings were placed in boxes (250 L⁻¹) at a stocking density of 50 fish/m³. Fish were acclimated to laboratory condition for 20 days.

2.3. Exposures

After acclimation silver catfish were transferred to glass boxes (45 L⁻¹) with controlled aeration and temperature. Groups of 10 fish per box in triplicate were exposed for 96 h to different 2,4-D concentrations until obtained LC₅₀ value. 2,4-D concentrations (nominal value) ranging from 1 to 780 mg L⁻¹. For each herbicide concentration test, a set of 10 fish per box (triplicate) was used as a control group (same condition without herbicide) and sampled at each time. Mortality for each concentration was recorded for estimation of LC₅₀. During the experiment, activity (normal, erratic swimming, lethargy) and feeding behavior (feeding or not) were observed, recorded and compared to control. After obtained LC₅₀ value another experiment were made. Another group of fish were acclimated (10 days) and after this period were redistributed in 45 L⁻¹ glass boxes (10 fish per box) and exposed to 2,4-D. The experiment was carried out in triplicate during 96 h with 4 treatments: 0 (without herbicide), 400, 600 and 700 mg/L of 2,4-D. Water quality characteristics were tested at the beginning, middle and end of exposure during LC₅₀ test and 96-h exposure. Mean values for test water qualities were as follows: temperature (23.0 ± 0.6 °C), dissolved oxygen (6.5 ± 0.1 mg/L), pH (7.4 ± 0.2 units), total ammonia (0.5 ± 0.2 mg/L), total alkalinity (55 ± 0.5 mg/L CaCO₃), and hardness (45 ± 1.0 mg/L CaCO₃). Water of the experimental period did not differ significantly between treatments (ANOVA). These parameters were measured as described by [25].

2.4. Enzyme assays

Tissues samples (brain and muscle) were homogenized in glass tubes under ice-bath with eight strokes of a motor driven Teflon

pestle for 2 min. Homogenates were centrifuged for 10 min at 3000g at 5 °C in 150 mM NaCl and supernatant was used as enzyme source. AChE activity was measured as described by [19] and modified by [20]. Suitable amounts (50–100 µl) of homogenate were incubated at 25 °C for 2 min with 0.8 mM acetylthiocholine as substrate and 1.0 mM 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) as chromogen. The reaction was buffered with 0.1 M K-phosphate pH 7.5 for a final volume of 2.0 ml. The enzyme activity was followed at 412 nm and the protein content of medium reaction was determined according to [21] using bovine serum albumin as standard. Enzyme activity is expressed as µmol of acetylthiocholine hydrolyzed per min per g of protein.

2.5. Tissue extracts and metabolite determination

At the end of exposure period (96 h), all fish were sampled and blood was collected from the caudal vein with a 1 ml heparinized syringe. The blood was centrifuged (10 min, 3000g, 4 °C) and used for glucose determination. Plasma glucose was measured by the glucose oxidase (Labtest Kit). Tissues (liver and white muscle) were removed and place on ice, frozen in liquid nitrogen and then stored at -20 °C. Tissue samples (50 mg⁻¹) were mechanically disrupted with 20% of trichloroacetic acid (TCA) using a motor driven Teflon pestle and centrifuged at 10,000g for 10 min for flocculation of the proteins. Acid extracts protein free were used for estimated glucose [22] and lactate [23]. All methods were adapted to fish in our Laboratory. Tissue glycogen was determined after KOH and ethanol addition for hydrolysis and precipitation of glycogen according to [24]. Suitable aliquots were used for glycogen (glucosyl-glucose) estimation according to [22].

2.6. Histological technical

For histological examinations liver slices were immediately removed and fixed in Bouin's solution, washed with 70% ethanol and dehydrated through a graded series of ethanol. They were embedded in paraffin, sectioned at 5 µm thickness using a rotary microtome. Sections were rehydrated in distilled water and stained with hematoxylin and eosin (H-E). For examined abnormalities was used microscope Olympus BX 41. For histological analysis were used only treatments 0 (control) and 700 mg/L.

2.7. Analysis statistics

The mean LC₅₀ for 96 h was calculated using probit analysis as described by [41]. Experimental design was fully randomized, with three replicates per treatment (n = 10). All data are expressed as means ± SEM, with significance level set at (P < 0.05). Metabolic and enzymes parameters were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple range test when appropriate using Statistical program for Windows, version 4.5, 1993.

3. Results

The LC₅₀ obtained for 2,4-D was 745 mg L⁻¹ (confidence interval 730–760). During experimental period fish exhibited some behavior alterations as lethargy and erratic swimming (Table 2). Brain AChE activity was higher than that of white muscle in *Rhamdia quelen* (16.2 and 9.5 µmol/min/g protein, respectively). Exposition to 2,4-D for 96 h increased brain AChE activity (P ≤ 0.01) in two treatments (600 and 700 mg L⁻¹) while in muscle tissue maximum AChE reduction was about 90% in jundia in the studied concentrations (P ≤ 0.01) (Fig. 1). After 4 days of 2,4-D exposure hepatic glycogen levels decreased in fingerlings in all concentrations tested

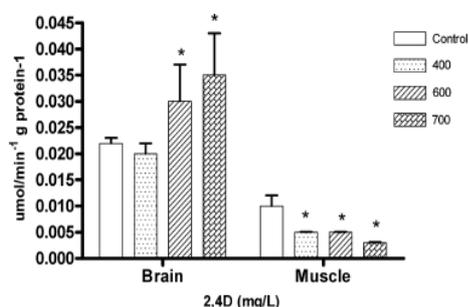


Fig. 1. AChE activity in the brain (○) and muscle (●) of *Rhamdia quelen* exposed to 400, 600 and 700 mg L⁻¹ of 2,4-D. AChE activities were expressed as µmol/min/g protein. Values significant different from control are indicated as $P \leq 0.01$ ($n = 10$).

($P < 0.01$). Hepatic glycogen reduction ranging from 47.67% (400 mg L⁻¹) until 59.3% (700 mg L⁻¹). In this tissue lactate levels was reduced in all concentrations tested and glucose levels decrease only at 700 mg/L as compared with control values (Table 1). Liver glycogen and glucose reduction is accompanied by a considerable rise in plasma glucose levels (Table 1). Fish exposed to 2,4-D showed decreased glycogen at all concentrations tested and glucose levels at 700 mg L⁻¹ in muscle tissue as compared to control values ($P \leq 0.01$). White muscle lactate levels increase at all concentrations tested ($P \leq 0.01$). The histological analysis showed alterations in *Rhamdia quelen* liver after exposure to 2,4-D herbicide. In 700 mg L⁻¹ concentration changes as abnormal arrangement of hepatocytes cords, cell membrane rupture and hepatocytes vacuolation (Fig. 2B) were observed in optic microscope with magnification 400×.

Table 1
Metabolic parameters of plasma and tissues of *Rhamdia quelen* exposed at sub-lethal concentration of 2,4-D

	Herbicide 2,4-D (mg L ⁻¹)			
	0	[400]	[600]	[700]
<i>Liver</i> (µmol g ⁻¹ tissue)				
Glycogen	86 ± 11	45 ± 2.5 ^a	37 ± 1.7 ^a	35 ± 1.5 ^a
Glucose	3.4 ± 0.03	3.5 ± 0.05	3.0 ± 0.5	2.5 ± 0.1 ^a
Lactate	12 ± 0.5	7.5 ± 0.3 ^a	7.0 ± 0.2 ^a	6.5 ± 0.5 ^a
<i>White muscle</i> (µmol g ⁻¹ tissue)				
Glycogen	8.6 ± 0.6	4.9 ± 0.5 ^a	4.0 ± 0.8 ^a	5.2 ± 0.9 ^a
Glucose	2.4 ± 0.01	2.5 ± 0.02	2.6 ± 0.01	1.8 ± 0.1 ^a
Lactate	20 ± 0.5	25 ± 0.4 ^a	27 ± 0.3 ^a	28 ± 0.2 ^a
<i>Plasma</i>				
Glucose (mg dl ⁻¹)	40 ± 0.5	45 ± 0.75	42 ± 0.8	60 ± 1.5 ^a

^a Indicate significant difference ($P \leq 0.01$) of control group (0) mg L⁻¹ ($n = 10$). Metabolic parameters were expressed as (µmol⁻¹ g⁻¹ tissue), and plasma glucose as (mg dl⁻¹).

Table 2
Lethal concentration and effects of different concentrations of 2,4-D (mg L⁻¹) on feeding behavior, activity and brain muscle AChE activity (% of control) in silver catfish fingerlings

2,4-D mg L ⁻¹	Activity	Feeding behavior	Mortality	Brain AChE Activation (%)	Muscle AChE Inhibition (%)
0	Normal	normal	No	0	0
400			No	0	0
600	Lethargic	Normal	30%	50	50
700	Erratic swimming	Not feeding	40%	75	75
745	Erratic swimming	Not feeding	50%	86.25	85

100% activity = 0.02 or 0.01 µmol of acetylthiocholine min⁻¹ per g⁻¹ of protein, respectively, for brain and muscle.

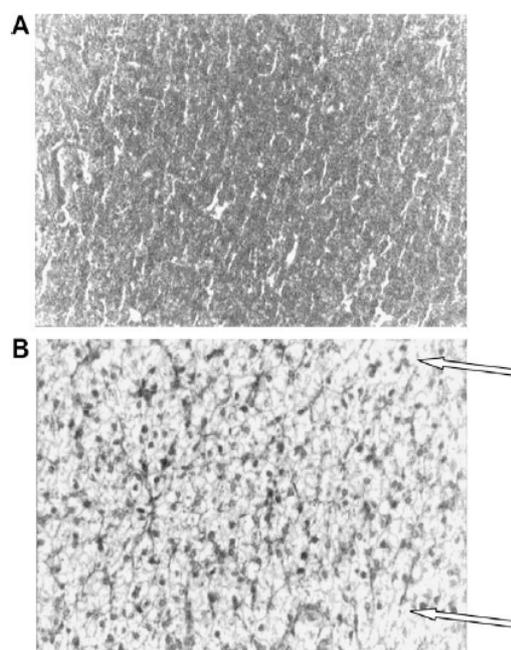


Fig. 2. (A) Liver of *Rhamdia quelen* of the control group showing normal hepatocytes. (Arrow). HE × 400. ($n = 10$). (B) Liver of *Rhamdia quelen* after exposure 700 mg L⁻¹ of 2,4-D, showing abnormal cords arrangement and vacuolation of hepatocytes. (Arrow). HE × 400. ($n = 10$).

4. Discussion

The present study pointed out significant effects on brain and muscle AChE activity of *Rhamdia quelen* exposed to commercial formulation containing 2,4-D. However it is surprise that brain showed increase of AChE activity while muscle showed reduction. The stress generated by 2,4-D exposure can increase reactive oxygen species in brain and thus promote undesirable effects as enzyme activation. Recently some authors showed that increase reactive oxygen species could be linked with brain AChE inhibition, or impaired brain functions [42]. On the contrary muscle tissue showed a significant inhibition in the AChE activity in response to 2,4-D exposure (Fig. 1). In the same way muscle AChE activity in European eels (*Anguilla anguilla*) exposed to 0.22 mg/L of thio-bencarb herbicide was depressed 35% in a 96 h test, and eels showing tremors, lethargy and erratic swimming [11]. Exposure to 50 µg/L of carbofuran for 48 h inhibited 23% of the AChE activity in skeletal muscle of goldfish [15]. Changes in AChE activity observed in this study could be reflected in movement disturbances. During the experimental period, fishes showed lethargy and erratic swimming (Table 2). Signs of lethargy have been also reported in

fish exposed to other pollutants such as cooper [27]. Fernández-Vega et al. [28] has described clinical signs of restlessness, erratic swimming, tremors, hipoactivated state and lethargy in *Anguilla anguilla* poisoned with a carbamate pesticide. In the same specie *R. quelen* another study showed behavior alterations after exposure to clomazone, quinclorac and metsulfuron methyl at concentrations near of LC_{50} [12]. On the contrary that in muscle tissue, there was an increase on brain AChE activity after 2,4-D exposure. This contradictory result could represent fish response against possible stress caused by 2,4-D. Animals could be compensating the metabolic stress enhancing brain AChE activity. The brain AChE activation observed after exposure to 2,4-D also could represent an increase in the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine, with consequent decrease activation of nicotinic and muscarinic receptors. In fact, activation or inhibition of AChE activity can influence cholinergic neurotransmission process. The similar AChE activation was showed also in brain of *R. quelen* exposed to herbicides quinclorac and metsulfuron methyl [12]. However, when another native fish species of Southern Brazil *Leporinus obtusidens* were exposed to 2,4-D at environmental relevant concentrations brain showed inhibition at concentrations of 10 mg L^{-1} and muscle at both concentrations tested (1 or 10 mg L^{-1}) [43]. In fact 2,4-D causes changes in the animal nervous system through complex formation with acetylcholine and inhibition of acetylcholinesterase [4,43], in this study 2,4-D could be change brain and muscle AChE activity and this result could reflect in behavior alterations. The sum of results of this study concerning AChE, metabolic parameters and histological analyses may be related to the 2,4-D herbicide or their metabolites since about 70% of 2,4-D residues were found in water samples under laboratory conditions [43]. However, information on the aquatic toxicity of 2,4-D on non-target organisms is either incomplete. Some formulations of 2,4-D were reported highly toxic to fish and others were less so [4].

In teleosts the main site of glycogen synthesis and storage is the liver, which is also the most important metabolic center for detoxification of chemicals and glucose production and storage [29,30]. Hepatic glycogen is a source of glucose and it acts in the vertebrate organism, helps regulating blood glucose levels [30–32]. Our results showed that exposure of silver catfish fingerlings to 2,4-D alter muscle and hepatic glycogen levels. These results are in agreement with [33], who reported a decrease in muscle glycogen level in eels (*Anguilla anguilla*) after lindane exposure. DDT and endosulfan caused depletion of liver and muscle glycogen in *Oreochromis mossambicus* accompanied by a considerable rise in plasma glucose levels [34]. In the same way, in this study, hepatic glycogen and glucose reduced and plasma glucose levels raised after 2,4-D exposure. *Cyprinus carpio* exposed to 2,4-D showed elevated serum glucose and decreased levels of tissue glycogen following acute exposure to herbicide 2,4-D [35]. The decrease in hepatic glucose observed in silver catfish, could be part of a mechanism mobilizing energy sources against possible stress caused by 2,4-D exposure. Depletion of glycogen store due to utilization of carbohydrates for energy production could be result of herbicide-induced hypoxia. Some authors usually describe this strategy for other fish exposed to agrochemicals [8,35–37].

Histological analyses reveal that *R. quelen* has resistant until 745 mg L^{-1} of herbicide 2,4-D but the concentration ranging from 200 until 700 mg L^{-1} alters enzyme and metabolic parameters. The concentration of 700 mg L^{-1} provokes cell damage. Similar results concerning histology damage were observed by [38], like vacuolation of hepatocytes and pycnotic nucleus in liver carps exposed to 0.02 mg L^{-1} of herbicide trifluralin. Other study showed histological alterations after exposure to agrochemicals and some authors suggest that alterations can result in malfunctioning of several organ systems of the fish [39]. Disorders in hepatocytes cords, rupture of the cell membrane, cytoplasm vacuolated were

histological changes found in liver of *Tilapia mossambica* after exposure to organophosphorus insecticide for 5 days [40]. Herbicide concentrations near those used in agriculture cause histological liver alterations in *Rhamdia quelen* [14]. These histological alterations occur because liver is the metabolic center for detoxification, and concentration of this compound could involve metabolic process and produce pathological lesions.

5. Conclusion

The results obtained allow us to conclude that 2,4-D affected AChE activity, as well some metabolic and histological parameters of this specie, indicating that short-term exposure could lead to an impairment of their physiologic conditions. The sum of results can be used as one early toxicity indicator that commercial formulation containing 2,4-D herbicide at high concentrations causes in *Rhamdia quelen*. However, more studies need to be made, especially for histopathology to obtain more specific conclusions about possible poisoning caused by environmentally relevant concentrations of 2,4-D.

References

- [1] R. Zanella, E.G. Primel, S.L.O. Machado, F.F. Gonçalves, E. Marchezan, Monitoring of the herbicide Clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Chromatography* 55 (2002) 573–577.
- [2] R. Sarikaya, M. Yilmaz, Investigation of acute toxicity and the effect of (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae), *Chemosphere* 52 (2003) 195–201.
- [3] S.R. Colby, R.G. Lym, E.R. Hill, W.J. Mc Avoy, L.M. Kitchen, R. Prasad, *Herbicide Handbook of the Weed Society of America*, sixth ed., Illinois, 1989.
- [4] A.C.K. Benli, R. Sarikaya, A. Sepici-Dincel, M. Selvi, D. Sahin, F. Erkok, Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823), *Pestic. Biochem. Physiol.* 88 (3) (2007) 296–299.
- [5] E.G. Primel, R. Zanella, M.H.S. Kurz, F.F. Gonçalves, S.Lde O. Machado, E. Marchezan, Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento, *Química Nova* 28 (4) (2005) 605–609.
- [6] C. Tomlin, *Pesticide Manual—Incorporating the Agrochemicals Handbook*, Crop Protection Publications, BCPC:Cambridge, UK, 2004.
- [7] B. Bukowska, K.K. Hutnik, 2,4-D and MCPA and their derivatives: effects on the activity of membrane erythrocytes acetylcholinesterase (in vitro), *Pestic. Biochem. Physiol.* 85 (2006) 174–180.
- [8] B. Jyothi, G. Narayan, Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus*, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 417–421.
- [9] E. Sancho, C. Fernandez-Vega, M. Sanchez, M.D. Ferrando, E. Andreu-Moliner, Alterations on AChE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 46 (2000) 57–63.
- [10] G.M. Chuiko, Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide, *Comp. Biochem. Physiol.* C 127 (2000) 233–242.
- [11] C. Fernández-Vega, E. Sancho, M.D. Ferrando, E. Andreu, Thiobencarb-induced changes in Acetylcholinesterase activities of the fish *Anguilla anguilla*, *Pestic. Biochem. Physiol.* 72 (2002) 55–63.
- [12] D. Miron, M. Crestani, M.R. Schetinger, V.M. Morsch, B. Baldissierotto, M.A. Tiemo, G. Moraes, V.L.P. Vieira, Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 61 (2005) 398–403.
- [13] L. Gluszcak, D.S. Miron, M. Crestani, M.B. Fonseca, F.A. Pedron, M.F. Duarte, V.L.P. Vieira, Effects of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 65 (2006) 237–241.
- [14] M. Crestani, C. Menezes, L. Gluszcak, 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.
- [15] S. Bretaud, J.P. Toutant, P. Saglio, Effects of Carbofuran, Diuron and Nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 47 (2000) 117–124.
- [16] H.M. Dutta, D.A. Arends, Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish, *Environ. Res.* 91 (2003) 157–162.
- [17] R. Paia, C.R. Townsend, B. Baldissierotto, Growth and survival of fingerlings of catfish exposed to different photoperiods, *Aquacult. Int.* 7 (1999) 201–205.

- [18] L.J.G. Barcellos, L.C. Krutz, R.M. Quevedo, I. Fioreze, A.B.S. Cericato, F. Ritter, Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard) in cages: cages type, stocking density and stress response to confinement, *Aquaculture* 232 (2004) 383–394.
- [19] G.L. Elman, K.D. Courtney, V.J.R. Andres, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
- [20] R. Villescas, R. Oswald, H. Marimoto, Effects of neonatal undernutrition and cold stress on behavior and biochemical brain parameters in rats, *J. Nutr.* 111 (1981) 1103–1110.
- [21] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [22] M. DuBoie, K.A. Gillis, J.K. Hamilton, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–358.
- [23] J.R. Harrower, C.H. Brown, Blood lactic acid—a micromethod adapted to field collection of microliter samples, *J. Appl. Physiol.* 52 (5) (1972) 709–711.
- [24] P.M. Bidinotto, G. Moraes, R.H.S. Souza, Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of microsamples, *Boletim Técnico CEPTA Pirassununga* 10 (1997) 53–60.
- [25] C.E. Boyd, C.S. Tucker, Water quality and pond soil analyses for aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama, USA, 1992, pp.183.
- [26] I.S. Singh, T.V. Reddy, Effects of copper sulfate on hematology, blood chemistry, and hepato-somatic index of an Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch.), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 20 (1990) 30–35.
- [27] C. Fernández-Vega, E. Sancho, M.D. Ferrando, E. Andreu, Thiobencarb toxicity and plasma AChE inhibition in the European eel, *J. Environ. Sci. Health* 34B (1) (1999) 61–73.
- [28] S. Singh, D.P. Bhati, Evaluation of liver protein due to stress under 2,4-D intoxication in *Channa punctatus*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53 (1994) 149–152.
- [29] R.K. Suarez, T.P. Mommensen, Gluconeogenesis in teleost fishes, *Can. J. Zool.* 65 (1987) 1869–1882.
- [30] T.P. Mommensen, T.W. Moon, Metabolic actions of glucagon-family hormones in liver, *Fish Physiol. Biochem.* 7 (1989) 279–288.
- [31] T.W. Moon, Glucagon: From hepatic binding to metabolism in teleost fish, *Comp. Biochem. Physiol.* B121 (1998) 27–34.
- [32] M.D. Ferrando, E. Andreu-Moliner, Effects of lindane on fish carbohydrate metabolism, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 22 (1991) 17–23.
- [33] A.D. Dangé, Changes in carbohydrate metabolism in tilapia, *Oreochromis* (Sarotherodon) *mossambicus*, during short-term exposure to different types of pollutants, *Environ. Poll. A* 41 (1986) 165–177.
- [34] E.O. Oruç, N. Üner, Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*, *Environ. Poll.* 105 (1999) 267–272.
- [35] S.R. Verma, S. Rani, P. I. Tonk, R.C. Dalela, Pesticide induced dysfunction in carbohydrate metabolism in three freshwater fishes, *Environ. Res.* 32 (1983) 127–133.
- [36] T. Gill, J. Pande, H. Tewari, In vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchonus* (Rosy barb), *Comp. Biochem. Physiol.* 100 (1991) 501–506.
- [37] V. Poleksic, V. Karan, Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 43 (1999) 213–221.
- [38] J.B. Ortiz, M.L. Gonzales de Canales, C. Sarasquete, Histopathological changes induced by lindane (γ -HCH) in various organs of fishes, *Scientia Marina* 67 (1) (2003) 53–61.
- [39] A.K. Desai, U.M. Joshi, P.M. Ambadkar, Histological observations on the liver of *Tilapia mossambica* after exposure to monocrotophos, an organophosphorus insecticide, *Toxicol. Lett.* 21 (1984) 325–331.
- [40] D.J. Finney, *Probit Analysis*, Cambridge University Press, Cambridge, 1971, pp. 144.
- [41] N. Üner, E.O. Oruç, Y. Sevigler, N. Sahin, H. Durmaz, D. Usta, Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21 (2006) 241–245.
- [42] M.B. da Fonseca, L. Glusczak, B.S. Moraes, C.C. de Menezes, A. Pretto, M.A. Tierno, R. Zanella, F.F. Gonçalves, V.L. Loro, The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 69 (2008) 416–420.

5 DISCUSSÃO

Este estudo mostra um grande efeito sobre atividade da AChE muscular e cerebral em peixes da espécie *Rhamdia quelen* expostos ao herbicida 2,4-D por 96 horas. No entanto, foi surpreendente que no cérebro a atividade da AChE mostrou-se significativamente aumentada nas maiores concentrações. O estresse gerado pelo 2,4-D pode aumentar a produção de espécies reativas no cérebro e, assim, promover efeitos indesejáveis, como a ativação enzimática. Recentemente alguns autores demonstraram que o aumento espécies reativas de oxigênio pode ser relacionado com a inibição da AChE cerebral, ou funções cerebrais comprometidas (ÜNER *et al.*, 2006, MIRON *et al.*, 2008). O 2,4-D em concentrações próximas as utilizadas nas lavouras reduz a atividade da AChE em cérebro e músculo de piavas (Fonseca *et al.*, 2008). Estes resultados nos levam a pensar que podem existir diferenças entre as espécies relacionadas a toxicidade de herbicidas. Ao contrário do que ocorreu em cérebro, o tecido muscular mostrou uma significativa inibição da atividade da AChE em resposta a exposição ao 2,4-D (Fig. 1). Da mesma forma atividade da AChE muscular de enguia européia (*Anguilla anguilla*), expostas a 0,22 mg L⁻¹ do herbicida tiobencarb mostraram uma depressão de 35% na atividade. Neste estudo também foi observado que os peixes tiveram tremores, apatia e natação errática (FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002). A exposição a 50 µg L⁻¹, por 48 horas de carbofuran inibiu 23% da atividade da AChE no músculo esquelético de peixe-dourado (BRETAUD *et al.*, 2000). As alterações na atividade AChE que foram observadas neste estudo poderiam refletir em distúrbios de movimento. Durante o período experimental, mostrou apatia e peixes com natação errática (Tabela 2). Sinais de letargia, foram igualmente notificados em peixes expostos a outros poluentes, como cobre (SINGH & REDDY, 1990). FERNÁNDEZ-VEGA *et al.* (1999) tem descrito sinais clínicos como: natação errática, tremores, letargia e estado de hipoatividade em *Anguilla anguilla* intoxicado com o pesticida carbamato. Em um estudo com a mesma espécie *R. quelen* alterações de comportamento foram observadas após exposição aos herbicidas clomazone, quinclorac e metasulfuron metil em concentrações próximas da CL₅₀ (MIRON *et al.*, 2005). Como observado ao contrário, do que foi observado no tecido muscular, no cérebro houve um aumento na

atividade da AChE após a exposição ao 2,4-D, este contraditório resultado poderia representar que os peixes estavam reagindo contra um eventual estresse causado pelo 2,4-D. Os animais poderiam estar compensando o estresse metabólico através do aumento da atividade da AChE cerebral. A ativação da AChE cerebral que foi observada após a exposição ao 2,4-D pode representar um aumento na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, com conseqüente diminuição da ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos. Assim, é visto que a ativação ou inibição da atividade da AChE pode influenciar no processo de neurotransmissão colinérgica e causar efeitos imprevisíveis como tremores, letargia e nado errático. Resultado semelhante com ativação da AChE cerebral foi mostrado em *R. quelen* expostos a herbicidas quinclorac e metasulfuron metil (MIRON *et al.*, 2005). No entanto, quando uma outra espécie de peixe nativo da região Sul do Brasil *Leporinus obtusidens* foram expostos ao 2,4-D em concentrações menores mostraram inibição da atividade da AChE cerebral nas concentrações de 10 mg L⁻¹ e no músculo em ambas as concentrações testadas (1 ou 10 mg L⁻¹) (FONSECA *et al.*, 2008). Na verdade o herbicida 2,4-D provoca alterações no sistema nervoso do animal através de um complexo de formação com acetilcolina e inibição da acetilcolinesterase (BENLI *et al.*, 2007, FONSECA *et al.*, 2008). No presente estudo 2,4-D alterou a atividade cerebral e muscular da enzima AChE e este resultado pode refletir em alterações no comportamento. A soma dos resultados obtidos neste estudo relativo a AChE, parâmetros metabólicos e histológicos podem ser relacionados com o herbicida 2,4-D ou seus metabólitos uma vez que cerca de 70% do 2,4-D foram encontrados em forma de resíduos nas amostras da água em condições de laboratório em um período de 96 horas (FONSECA *et al.*, 2008). Apesar de algumas formulações de 2,4-D já terem sido relatadas como altamente tóxicas para os peixes (BENLI *et al.*, 2007), as informações sobre a toxicidade aquática desse herbicida em organismos não-alvo ainda são bastante incompletas.

Nos teleósteos o principal local de síntese de glicogênio e de armazenagem é o fígado, que é também o mais importante centro de desintoxicação metabólica de produtos químicos e de produção e armazenamento de glicose (SUAREZ & MOMMENSEN, 1987; MOMMENSEN & MOON, 1989; SINGH & BHATI, 1994). O glicogênio hepático é uma fonte de glicose que atua nos organismos de vertebrados,

ajudando na regulação dos níveis de glicose sanguínea (SUAREZ & MOMMSEN, 1987; MOON, 1998). Os resultados deste estudo mostraram que a exposição de alevinos de jundiá ao 2,4-D reduz os níveis de glicogênio muscular e hepático. Estes resultados estão de acordo com FERRANDO & ANDREU-MOLINER (1986), que relataram uma diminuição dos níveis de glicogênio muscular de enguias (*Anguilla anguilla*), após exposição ao lindano. O DDT e o endosulfan causaram uma depleção de glicogênio muscular e hepático em *Oreochromis mossambicus* acompanhado por um aumento considerável de glicose plasmática (DANGÉ, 1986). De maneira similar, neste estudo o glicogênio e a glicose hepáticos mostraram-se reduzidos enquanto os níveis de glicose plasmática estavam elevados após a exposição ao 2,4-D. *Cyprinus carpio* expostos ao 2,4-D apresentaram níveis séricos elevados de glicose e diminuição dos níveis de glicogênio tecidual seguido da exposição aguda ao herbicida 2,4-D (ORUÇ & ÜNER, 1999). O decréscimo na glicose, do lactato e do glicogênio hepático foi observado nos jundiás, podendo ser parte de um mecanismo de mobilização de fontes energéticas contra o possível estresse causado pela exposição ao 2,4-D, que conseqüentemente também aumentou a glicemia dos peixes. Da mesma forma a, a depleção do estoque do glicogênio do músculo devido à utilização de hidratos de carbono para a produção de energia via resposta fermentativa poderia ser resultado da hipóxia muscular induzida pelo herbicida, o que justificaria o aumento do lactato no músculo branco dos jundiás. Alguns autores descrevem geralmente esta estratégia para outros peixes expostos a agrotóxicos (VERMA *et al.*, 1983; GILL *et al.*, 1991; JYOTHI & NARAYAN, 1999; ORUÇ & ÜNER, 1999).

A análise histológica revelou que existe resistência da *R. quelen* até 745 mg L⁻¹ do herbicida 2,4-D, mas em concentrações variando entre 200 até 700 mg L⁻¹ já ocorrem modificação enzimáticas e de parâmetros metabólicos, e na concentração de 700 mg L⁻¹ aparece um dano celular significativo. Resultados similares relacionados à histologia foram observados por (POLEKSIC & KARAN, 1999), como vacuolização dos hepatócitos e núcleos picnóticos no fígado de carpas expostas a 0,02 mg L⁻¹ do herbicida trifluralina. Outro estudo mostrou alterações histológicas após a exposição a agrotóxicos e alguns autores sugerem que as alterações podem resultar em mau funcionamento dos vários sistemas orgânicos dos peixes (ORTIZ *et al.*, 2003). Os

distúrbios nos cordões dos hepatócitos, a ruptura da membrana celular, a vacuolização citoplasmática foram alterações histológicas encontradas no fígado de *Tilapia mossambica* após a exposição aos inseticidas organofosforados durante cinco dias (DESAI *et al.*, 1984). As alterações histológicas observadas neste trabalho ocorreram, provavelmente, pelo fígado ser o centro para detoxificação, e a alta concentração do 2,4-D neste órgão pode ter influenciado no processo metabólico e conseqüentemente ter produzido lesões patológicas.

Os resultados obtidos permitem concluir que o 2,4-D afeta a atividade da enzima AChE, bem como alguns parâmetros metabólicos e histológicos desta espécie de peixe, indicando que a curto prazo poderia levar a uma exposição comprometimento de suas condições fisiológicas. A soma dos resultados pode ser utilizada como um indicador precoce toxicidade que formulação comercial contendo herbicida 2,4-D em altas concentrações causa em *Rhamdia quelen*. No entanto, mais estudos precisam ser realizados, especialmente histopatológicas, para obter conclusões mais específicas acerca de possíveis intoxicações causadas pelo 2,4-D.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Foi encontrada uma CL50 de 745 mg/L para os jundiás expostos ao 2,4-D por 96 horas
- ✓ Após exposição de 96 h dos peixes da espécie *Rhamdia quelen*, ao herbicida 2,4-D, houve aumento na glicemia após adicionado 700 mg/L do contaminante, o que indica uma resposta secundária ao estresse causado pelo herbicida
- ✓ Os intermediários metabólicos (glicogênio, glicose e lactato) em músculo e fígado de jundiás foram alterados quando estes organismos foram expostos a esta formulação comercial. Os peixes utilizaram mecanismos compensatórios na tentativa de aumentar energia para metabolizar o herbicida. E o músculo branco mostrou uma resposta fermentativa pelo provável estresse causado, como observado pelo consumo de glicogênio e produção de lactato
- ✓ O herbicida 2,4-D causa alterações na atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro e no músculo dos peixes. Sendo que, as alterações musculares podem estar relacionadas com os distúrbios comportamentais, tais como letargia e nado errático, visualizados durante o experimento
- ✓ A exposição aguda ao 2,4-D causou vacuolização, ruptura das membranas dos hepatócitos e alterações no arranjo dos cordões hepáticos, na maior concentração testada, o que indica que os peixes resistem à altas concentrações desse herbicida em água, no entanto, sofrem algumas alterações significativas nas células hepáticas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. Criação de jundiá. Santa Maria: **Editora da UFSM**, p. 232, 2004.

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

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A. P.; WOEHL, V. M.; QUEVEDO, R. M.; ITTZÉS, 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) and hormonal and biochemical changes after acute stress. **Aquac Res**, v. 34, p. 1465-1469, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

DANGÉ, A.D. Changes in carbohydrate metabolism in tilapia, *Oreochromis* (Sarotherodon) *mossambicus*, during short-term exposure to different types of pollutants, **Environ Poll**, v. A 41, p. 165–177, 1986.

DESAI, A.K.; JOSHI, U.M.; AMBADKAR, P.M. Histological observations on the liver of *Tilapia mossambica* after exposure to monocrotophos, an organophosphorus insecticide, **Toxicol Lett**, v. 21 p. 325–331, 1984.

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

FERNÁNDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Thiobencarb toxicity and plasma AChE inhibition in the European eel, **J Environ Sci Health**, v. 34B (1) p. 61–73, 1999.

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

FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. Effects of lindane on fish carbohydrate metabolism, **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 22, p.17–23, 1991.

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

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

GILL, T.; PANDE, J.; TEWARI, H. In vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchonioides* (Rosy barb), **Comp Biochem Physiol**, v. 100, p. 501–506, 1991.

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

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

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

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

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.

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

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

KÖHLER, A., DEISEMANN, H.; LAURITZEN, B. Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. **Mar Ecol Prog Ser**, v. 91, p. 141 – 153, 1992.

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

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

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

MOMMENSEN, T.P.; MOON, T.W. Metabolic actions of glucagon-family hormones in liver, **Fish Physiol Biochem**, v. 7, p. 279–288, 1989.

MOON, T.W. Glucagon: From hepatic binding to metabolism in teleost fish, **Comp Biochem Physiol**, v. B121, p. 27–34, 1998.

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

NIGG, H.N.; KNAAK, J.B. Blood Cholinesterases as Human Biomarkers of Organophosphorus Pesticide Exposure. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 163, p. 29-112, 2000.

ORTIZ, J.B.; GONZALES DE CANALES, M.L.; SARASQUETE, C. Histopathological changes induced by lindane (c-HCH) in various organs of fishes, **Sci Mar**, v. 67 (1) p. 53–61, 2003.

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 Poll**, v. 105, p. 267-272, 1999.

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

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

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

PIAIA, R.; TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* exposed to different light regimes. **Aquacult Int**, v. 7, p. 201-205, 1999.

POLEKSIC, V.; KARAN, V. Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation, **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 43, p. 213–221, 1999.

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

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

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

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

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

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

SINGH, S.; Singh, T.V. Reddy, Effects of copper sulfate on hematology, blood chemistry, and hepato-somatic index of an Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch.), **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 20, p. 30–35, 1990.

SINGH, S.; BHATI, D.P. Evaluation of liver protein due to stress under 2,4-D intoxication in *Channa punctatus*, **Bull. Environ Contam Toxicol**, v. 53, p. 149–152, 1994.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, p. 294-302, 2001.

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

SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, M., HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluated contaminant-related stress in fish. **J Aquat Ecosyst Stress Recov**, v. 6, p. 75 – 86, 1997

STEGEMAN, J.J., LECH, J.J. Cytochrom p-450 monoocygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environ Health Persp**, v. 90, p. 93 – 100, 1991.

SUAREZ, R.K.; MOMMENSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes, **Can. J Zool**, v. 65, p. 1869–1882, 1987.

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

TEH, S.J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquat Toxicol**, v. 37, p. 51 – 70, 1997.

THOMAS, P. Molecular and Biochemical Responses of Fish to Stressors and Their Potential Use in Environmental Monitoring. **Amer Fish Soc Symp**, v. 8, p. 9 – 28. 1990.

ÜNER, N.; ORUÇ, E. Ö.; SEVGILER, Y.; SAHIN, N.; DURMAZ, H.; USTA, D. Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 21, p. 241-245, 2006.

VERMA, S.R.; RANI, S.; TONK, P. I.; DALELA, R.C. Pesticide induced dysfunction in carbohydrate metabolism in three freshwater fishes. **Environ Res**, v. 32, p.127–133, 1983.