



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

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS EM CARPAS (*Cyprinus
carpio*) EXPOSTAS AO FUNGICIDA
TEBUCONAZOLE (FOLICUR[®] 200 EC)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cândida Toni

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS EM CARPAS (*Cyprinus carpio*)
EXPOSTAS AO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE
(FOLICUR[®] 200 EC)**

por

Cândida Toni

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 Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Prof.^a Dra. 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

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS EM CARPAS (*Cyprinus carpio*)
EXPOSTAS AO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE (FOLICUR[®] 200 EC)**

elaborada por
Cândida Toni

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Vania Lucia Loro
(Presidente/Orientadora)

Prof.^a Dra. Vera Maria Morsch (UFSM)

Prof. Dr. João Radünz Neto (UFSM)

Santa Maria, 22 de julho de 2010.

*Aos meus pais Ivo e Anita, pelo amor incondicional,
pelo incentivo a seguir com os estudos,
demonstrando que este não é apenas o
melhor caminho a seguir, mas também a maior
e melhor herança que os pais podem deixar
aos filhos, dedico este trabalho.
Sei o quanto isso representa a vocês e o
quanto se realizam através desta conquista.*

Amo vocês... para sempre!!!!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades que surgiram ao longo desta, por me guiar, iluminar meu caminho e dar forças para superar as adversidades;

Agradeço a toda minha família pelo apoio e confiança, por terem acreditado em mim em todos os momentos. Certamente vocês fazem parte desta conquista, por seu amor, pelos conselhos e palavras de incentivo, minha eterna gratidão;

À minha orientadora, professora Vania Lucia Loro, por “abrir as portas” de seu laboratório para mim, pela oportunidade de realizar este trabalho, por todos os ensinamentos que certamente contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal;

Às colegas de laboratório Adriana, Bárbara, Charlene, Daiane, Jossiele, Maria Luiza, Roberta e Thaís, pelos momentos compartilhados ao longo desta caminhada. Momentos de trabalho, de seriedade... momentos de descontração e alegria. Pela amizade também fora do laboratório. Algumas mais “antigas” outras mais recentes, pessoas com quem tive o prazer de conviver e aprender com cada uma algo que levarei comigo para sempre;

Às colegas Bibiana e Alexandra, que embora tenha convivido por pouco tempo, serviram como exemplo de dedicação e competência nos trabalhos realizados;

Ao professor Leonardo José Gil Barcellos e seu grupo de pesquisa da Universidade de Passo Fundo, pelo auxílio na realização de mais um trabalho;

Aos professores do curso pelos ensinamentos e experiências compartilhadas;

Aos professores Vera Maria Morsch e João Radünz Neto por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação;

À UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica, que buscam constantemente a excelência nos trabalhos, formando e qualificando profissionais há anos;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

A todas as pessoas não nomeadas aqui, mas que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

***“A diferença entre o possível e o impossível
está na vontade humana”.***
(Louis Pasteur)

RESUMO

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

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS EM CARPAS (*Cyprinus carpio*) EXPOSTAS AO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE (FOLICUR® 200 EC)

AUTORA: CÂNDIDA TONI

ORIENTADORA: VANIA LUCIA LORO

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de julho de 2010.

O intenso uso e/ou manejo inadequado de pesticidas têm levado à contaminação do ecossistema aquático, atingindo a biota ali existente, incluindo os peixes. Pesticidas podem afetar parâmetros toxicológicos desses animais, prejudicando sua sobrevivência. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar alterações bioquímicas em carpas (*Cyprinus carpio*) após exposição a uma formulação comercial do fungicida tebuconazole (Folicur®). Num primeiro momento, foi realizado um teste de toxicidade aguda a fim de determinar a CL₅₀ (96h) do tebuconazole para *C. carpio*. Os animais foram expostos às concentrações 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 mg/L, durante 96 horas. Após esse período, foram anestesiados e eutanasiados. Utilizando o método whole-body, foram investigados os níveis de TBARS, proteína carbonil, atividades das enzimas GST, CAT, SOD e AChE, níveis dos antioxidantes não enzimáticos GSH e AsA e parâmetros metabólicos, dentre os quais, lactato, glicogênio, glicose, amônia, aminoácidos e proteína. Num segundo momento, os peixes foram expostos ao fungicida durante sete dias, tanto em condição de campo (lavoura de arroz irrigado) como de laboratório. As concentrações utilizadas em laboratório (33,5 e 36,2 µg/L) foram próximas à concentração utilizada na lavoura de arroz (31,9 µg/L). Decorridos os períodos experimentais, foram amostrados cérebro, fígado e músculo dos peixes. Os parâmetros bioquímicos analisados foram os seguintes: níveis de TBARS em cérebro, fígado e músculo; proteína carbonil em fígado; atividades das enzimas CAT e GST em fígado e da AChE em cérebro e músculo. No primeiro experimento obteve-se como CL₅₀ (96h) do tebuconazole para *C. carpio* a concentração 2,37 mg/L. Os níveis corporais de TBARS mostraram-se elevados em todas as concentrações testadas. Ao contrário, as enzimas GST, CAT e SOD mostraram redução em suas atividades. Os níveis de GSH e AsA também se mostraram diminuídos após o mesmo período. Em relação à atividade da AChE e aos níveis de proteína carbonil, não foram observadas alterações estatisticamente significativas. Dentre os parâmetros metabólicos, houve aumento nos níveis de glicogênio e glicose na concentração 1,5 mg/L, enquanto que os níveis de proteína foram reduzidos nas concentrações 2,0 e 2,5 mg/L. No segundo experimento, observou-se aumento nos níveis de TBARS em cérebro somente na condição de campo, enquanto que em fígado e músculo esse aumento foi verificado tanto em campo quanto em laboratório. Da mesma forma, os níveis de proteína carbonil aumentaram em ambas as condições experimentais. A atividade da AChE em cérebro se mostrou

aumentada somente em condição de campo, enquanto que em laboratório nenhuma alteração significativa foi observada. As atividades da CAT, GST e AChE em músculo não apresentaram mudanças significativas em ambas as condições experimentais. Os resultados da presente investigação, considerando os dois experimentos realizados, mostram que esse fungicida provoca desordens em parâmetros antioxidantes e metabólicos nos peixes expostos, indicando a ocorrência de estresse oxidativo, o que pode comprometer sua sobrevivência no meio natural. A avaliação dos níveis de TBARS e de proteína carbonil em fígado de carpas pode ser utilizada como biomarcador de exposição ao tebuconazole.

Palavras-chave: *Cyprinus carpio*; estresse oxidativo; tebuconazole; toxicidade.

ABSTRACT

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

BIOCHEMICAL RESPONSE IN CARP (*Cyprinus carpio*) EXPOSED TO FUNGICIDE TEBUCONAZOLE (FOLICUR® 200 EC)

AUTHOR: CÂNDIDA TONI

ADVISOR: VANIA LUCIA LORO

Data and Place of the defense: July, 22th, 2010, Santa Maria.

The intensive use and/or inadequate management of pesticides have led to contamination of the aquatic ecosystem, reaching the biota living there, including the fish. Pesticides can affect toxicological parameters these animals, harming their survival. In this way, the aim this study has to evaluate biochemistry changes in carps (*Cyprinus carpio*) after exposure to a commercial formulation of the fungicide tebuconazole (Folicur®). At first, we performed a test of acute toxicity to determine the LC₅₀ (96h) of tebuconazole for *C. carpio*. The animals were exposed to concentrations 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mg/L for 96 hours. After this period, were anesthetized and euthanized. Using the whole-body method, we investigated the levels of TBARS, protein carbonyls, activities of enzymes GST, CAT, SOD and AChE, levels of non-enzymatic antioxidants GSH and AsA and metabolic parameters, among which, lactate, glycogen, glucose, ammonia, amino acids and protein. Secondly, fish were exposed to the fungicide during seven days, both in field conditions (rice paddy field) as a laboratory. The concentrations used in the laboratory (33.5 and 36.2 mg/L) were close to the concentration used for rice farming (31.9 mg/L). After the experimental periods, we sampled brain, liver and muscle of fish. The biochemical parameters analyzed were as follows: TBARS levels in brain, liver and muscle, protein carbonyl in liver, enzyme activities CAT and GST in liver and AChE in brain and muscle. In the first experiment was obtained as LC₅₀ (96h) of tebuconazole for *C. carpio* concentration 2.37 mg/L. The body levels of TBARS showed to be high at all concentrations tested. In contrast, the enzymes GST, CAT and SOD showed reduction in their activities. The levels of GSH and AsA were also decreased after the same period. Regarding the activity of AChE and the levels of protein carbonyls, there were no statistically significant changes. Among the metabolic parameters, there was an increase in the levels of glycogen and glucose concentration 1.5 mg/L, whereas protein levels were reduced at concentrations 2.0 and 2.5 mg/L. In the second experiment, we observed increased levels of TBARS in brain only in the field condition, while in liver and muscle this increase was observed both in field and laboratory. Likewise, the levels of protein carbonyls increased in both experimental conditions. The activity of AChE in brain was increased only in the field condition, whereas in the laboratory no significant change was observed. The activities of CAT, GST and AChE in muscle showed no significant change in both experimental conditions. The results of this research, considering the two experiments show that this fungicide causes disorders in antioxidants and metabolic

parameters in fish exposed, indicating the occurrence of oxidative stress, which can compromise their survival in the wild. The evaluation of TBARS levels and protein carbonyl in the liver of carp can be used as a biomarker of exposure to tebuconazole.

Keywords: *Cyprinus carpio*; oxidative stress; tebuconazole; toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Movimento dos pesticidas em ecossistemas aquáticos.....	20
FIGURA 2 – Estrutura química do tebuconazole.....	21
FIGURA 3 – Exemplar de <i>Cyprinus carpio</i>	22
FIGURA 4 – Degradação da acetilcolina em colina e acetato pela AChE.....	23
FIGURA 5 – Dano ao DNA, lipídios e proteínas por EROs.....	25

MANUSCRITO I

FIGURE 1 – Levels of TBARS (nmol MDA/mg protein) in <i>Cyprinus carpio</i> after exposure to different concentrations of tebuconazole for 96 h. Mean \pm SD; n = 6. * $p \leq 0.05$ respect to control group.....	48
FIGURE 2 – Activity of glutathione S-transferase (μ mol GS-DNB/min/mg protein) in <i>Cyprinus carpio</i> after exposure to different concentrations of tebuconazole for 96 h. Mean \pm SD; n = 6. * $p \leq 0.05$ respect to control group.....	48
FIGURE 3 – Glutathione levels (μ mol GSH/g fish) in <i>Cyprinus carpio</i> after exposure to different concentrations of tebuconazole for 96 h. Mean \pm SD; n = 6. * $p \leq 0.05$ respect to control group.....	49
FIGURE 4 – Ascorbic acid levels (μ mol AsA/g fish) in <i>Cyprinus carpio</i> after exposure to different concentrations of tebuconazole for 96 h. Mean \pm SD; n = 6. * $p \leq 0.05$ respect to control group	49

MANUSCRITO II

FIGURE 1 – TBARS levels (nmol MDA/mg of protein) in brain, liver and muscle tissues of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to commercial fungicide containing tebuconazole at rice field (A) and laboratory conditions (B) for 7 days. Data represent the mean \pm SD (n = 15). *Indicates significant difference respect to control group ($p \leq 0.05$).....	69
FIGURE 2 – Protein carbonyl contents in liver of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to commercial fungicide containing tebuconazole at rice field (A) and laboratory conditions (B) for 7 days. Data represent the mean \pm SD (n = 15). *Indicates significant difference respect to control group ($p \leq 0.05$).....	70

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

TABLE 1 – Whole-body enzymes acetylcholinesterase (AChE – μmol of ASCh hydrolyzed/min/mg protein), catalase (CAT – $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) and superoxide dismutase (SOD – UI SOD/ mg protein) activities and protein carbonyl contents (nmol carbonyl/mg protein) of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to tebuconazole for 96 hours	50
TABLE 2 – Whole-body metabolic parameters of <i>Cyprinus carpio</i> exposed to tebuconazole for 96 hours.	51

MANUSCRITO II

TABLE 1 – Effects of tebuconazole on catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein), glutathione S-transferase (μmol GS-DNB/min/mg protein) and acetylcholinesterase (ASCh hydrolyzed/min/mg protein) activities in different tissues of <i>Cyprinus carpio</i> after 7 days of exposure in field and laboratory conditions. Data represent the mean \pm SD (n = 15)	71
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE: acetilcolinesterase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AsA: ácido ascórbico

CAT: catalase

CL₅₀ (96h): concentração letal que causa a mortalidade de 50% da população em 96 horas

CYP450: citocromo P450

DNA: ácido desoxirribonucléico

EC: concentrado emulsionável

EROs: espécies reativas de oxigênio

GR: glutathiona redutase

GPx: glutathiona peroxidase

GSH: glutathiona reduzida

GST: glutathiona S-transferase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

LPO: peroxidação lipídica

MDA: malondialdeído

O₂^{•-}: ânion superóxido

•OH: radical hidroxila

PPA: potencial de periculosidade ambiental

SOD: superóxido dismutase

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	08
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
APRESENTAÇÃO	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Pesticidas e o risco de contaminação dos recursos hídricos	19
3.2 Carpa (<i>Cyprinus carpio</i> L. 1758).....	21
3.3 Enzima acetilcolinesterase.....	23
3.4 Estresse oxidativo.....	24
3.5 Sistema de defesa antioxidante	26
3.6 Parâmetros metabólicos.....	28
4 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS	
4.1 Manuscrito I: Tebuconazole-mediated toxicity in <i>Cyprinus carpio</i> : LC ₅₀ -96 h determination and oxidative stress occurrence. Cândida Toni, Daiane Ferreira, Marcos Paulo Damaren Borges, Leonardo José Gil Barcellos, Vania Lucia Loro	30
4.2 Manuscrito II: Exposure to tebuconazole in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carps (<i>Cyprinus carpio</i>). Cândida Toni, Adriana Santi, Charlene Cavalheiro de Menezes, Roberta Cattaneo, Bárbara Estevão Clasen, Renato Zanella, Vania Lucia Loro	52
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita da seguinte forma: primeiramente são apresentados os itens **INTRODUÇÃO**, **OBJETIVOS** e **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** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

Durante séculos, pesticidas têm sido amplamente utilizados na agricultura com a finalidade de aumentar a produção, bem como, combater insetos, ervas-daninhas e ainda, fungos que possam atacar as culturas. Nos últimos 30 anos, seu uso tem se intensificado principalmente no Brasil, que se tornou um dos maiores consumidores desses produtos químicos, ficando atrás somente do Japão e dos Estados Unidos (DAMS, 2006). Segundo a ANVISA (2010), atualmente o Brasil se consolida como maior mercado e com maior ritmo de expansão no consumo de agrotóxicos em todo o mundo. Os pesticidas podem ser classificados em inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, bactericidas, nematocidas, rodenticidas, de acordo com a praga que combatem. O tebuconazole (Folicur[®]) [1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentano-3-ol] é um fungicida triazole, frequentemente usado em áreas agrícolas para o tratamento e proteção de cereais, soja e uma variedade de frutas (BEREZEN et al., 2005; KONWICK et al., 2006).

No sul do Brasil, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, é comum encontrar a prática da aqüicultura complementar à agricultura, uma vez que as lagoas utilizadas para piscicultura encontram-se próximas ou dentro de áreas agrícolas, ou ainda, recebem água que circula pelo solo cultivado (CERICATO et al., 2008). Devido à necessidade do uso de pesticidas para combater pragas de culturas, os resíduos desses compostos químicos podem atingir as lagoas onde são cultivados peixes, os quais são bastante sensíveis à contaminação do ambiente aquático.

Quando os pesticidas entram em contato com os peixes, podem causar alterações bioquímicas e fisiológicas, dependendo da concentração empregada, tempo de exposição e espécie exposta. Entre os efeitos deletérios provocados pelos pesticidas em peixes, podemos citar a ocorrência de estresse oxidativo, o qual leva à geração de radicais livres e alterações no sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático (ALMEIDA et al., 1997; FONSECA et al., 2008; TONI et al., 2010). O estado de estresse oxidativo é decorrente de um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes devido à depleção destes ou à superprodução de espécies

reativas de oxigênio (EROs), ou ambos, resultando em danos ao organismo (ISIK & CELIK, 2008).

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

Quando as defesas enzimáticas estão sob uma condição de estresse, componentes do sistema de defesa antioxidante não-enzimático, como a vitamina C, impedem a reação de auto-oxidação. O ácido ascórbico tem sido considerado como um fator essencial para atenuar alguns dos efeitos tóxicos dos radicais livres (SAYEED et al., 2003). A glutathione reduzida (GSH) é o principal tiol não-protéico e um dos principais agentes redutores encontrados nas células. Processos relacionados à GSH desempenham um papel central na defesa antioxidante por contribuir com inúmeros processos como o combate aos radicais livres, redução de peróxidos e detoxificação de compostos eletrofílicos (CNUBBEN et al., 2001).

Além de alterações no sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático, a peroxidação lipídica (LPO) também tem sido sugerida como um dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida por pesticidas (KEHRER, 1993). O processo de LPO é uma consequência importante do estresse oxidativo e tem sido investigado extensivamente em peixes (MIRON et al., 2008; FERREIRA et al., 2010). Como resultado do estresse oxidativo também pode ocorrer a formação de proteína carbonil, onde EROs podem alterar a estrutura e conseqüentemente a função das proteínas. Sendo assim, o número de grupos

carbonil correlaciona-se bem com os danos causados às proteínas em uma situação de estresse oxidativo (ALMROTH et al., 2005).

Para avaliar a neurotoxicidade de pesticidas em peixes, frequentemente é utilizada a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima constitui um parâmetro bastante usado em áreas poluídas por pesticidas, e sua atividade em tecidos é frequentemente diminuída após exposição a esses produtos. A inibição da atividade dessa enzima por diferentes poluentes pode afetar o crescimento, a sobrevivência, os hábitos alimentares e o comportamento reprodutivo de peixes expostos a diferentes poluentes (DUTTA & ARENDS, 2003). Parâmetros metabólicos também são muito usados para avaliar as condições de saúde dos peixes após exposição a pesticidas. Estudos têm demonstrado que alterações no metabolismo de proteína e carboidrato têm ocorrido em peixes que foram submetidos a uma condição de estresse (CRESTANI et al., 2006; FONSECA et al., 2008; SANCHO et al., 2010).

Vários estudos têm sido conduzidos no sentido de investigar alterações bioquímicas provocadas em peixes expostos a pesticidas, tanto em condições de campo quanto em laboratório (CATTANEO et al., 2008; MORAES et al., 2009; TONI et al., 2010). No entanto, ainda são escassos os trabalhos que abordam especificamente a toxicidade do fungicida tebuconazole em carpas (*Cyprinus carpio*), espécie utilizada em sistemas de policultivo, caracterizada por sua rusticidade e hábito alimentar onívoro. A determinação da concentração letal (CL₅₀) desse fungicida para carpa é um parâmetro importante que fornece informações acerca da toxicidade do produto sobre organismos não-alvo. Somado a isso, a avaliação de respostas bioquímicas em peixes expostos a pesticidas, a determinação de biomarcadores de estresse oxidativo e alterações comportamentais, podem servir como ferramentas a serem empregadas em programas para avaliação de risco ambiental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a concentração letal (CL₅₀) do fungicida tebuconazole (Folicur[®] 200 EC) para carpas (*Cyprinus carpio*) e avaliar alterações bioquímicas nesses peixes expostos a diferentes concentrações do fungicida em condições de campo (lavoura de arroz irrigado) e laboratório.

2.2 Objetivos específicos

- Testar a toxicidade aguda do tebuconazole para carpa (CL₅₀), utilizando diferentes concentrações do fungicida, durante 96 horas.
- Investigar possíveis alterações nos níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e de proteína carbonil em carpas expostas ao tebuconazole.
- Verificar os efeitos do fungicida sobre a atividade das enzimas acetilcolinesterase, glutathione S-transferase, superóxido dismutase e catalase.
- Determinar os níveis de antioxidantes não-enzimáticos: glutathione reduzida e ácido ascórbico.
- Analisar parâmetros metabólicos: lactato, glicogênio, glicose, amônia, aminoácido e proteína em peixes expostos ao fungicida.
- Comparar dados de campo e laboratório demonstrando a toxicidade do fungicida em diferentes condições experimentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pesticidas e o risco de contaminação dos recursos hídricos

O desenvolvimento da síntese orgânica durante a Segunda Guerra Mundial e a consolidação do padrão tecnológico da agricultura moderna tiveram importância fundamental no desenvolvimento da indústria mundial de agrotóxicos. O uso de pesticidas nas atividades agrícolas é necessário para a proteção das plantas cultivadas, a fim de que elas expressem todo seu potencial produtivo. No entanto, o manejo inadequado dos pesticidas em áreas agrícolas pode resultar na contaminação dos recursos hídricos (GUNNINGHAM & SINCLAIR, 2005).

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

Segundo a ANVISA (2010), considerando a sua toxicidade, os pesticidas estão distribuídos em quatro classes toxicológicas: Classe I – Pesticidas extremamente tóxicos; Classe II – Altamente tóxicos; Classe III – Medianamente tóxicos; Classe IV – Pouco tóxicos. A partir de 1996, o IBAMA passou a classificar os pesticidas quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental, considerando parâmetros como bioacumulação, transporte, persistência. Assim, segundo o PPA os pesticidas são ditos: altamente perigosos, muito perigosos, perigosos, pouco perigosos.

Entre as diferentes culturas, o arroz ocupa um lugar de destaque por seu “potencial de contaminação das águas superficiais com produtos químicos de origem agrícola”. A extensa área cultivada, o elevado número de tratamentos fitossanitários efetuados ao longo do seu ciclo natural, a aplicação de alguns pesticidas de elevada toxicidade para a biota aquática e sua estreita relação com o meio hídrico são fatores preponderantes para tal classificação. Uma vez no ambiente, os pesticidas tenderão a distribuir-se pelos diferentes compartimentos ambientais (água, solo,

sedimento, ar, biota) de acordo com suas propriedades físico-químicas e as características do meio (SILVA & SANTOS, 2007). Os pesticidas podem alcançar os ecossistemas aquáticos através da aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações (Figura 1). Na água, os resíduos de pesticida podem tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos como os peixes, podendo então ser detoxificados ou acumulados.

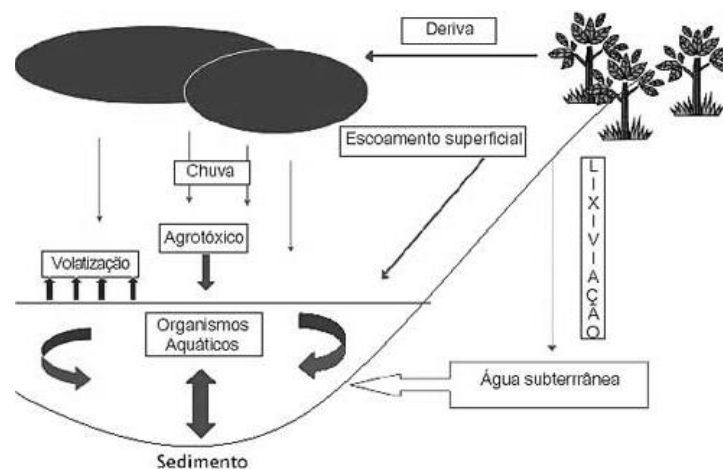


Figura 1 – Movimento dos pesticidas em ecossistemas aquáticos (Adaptado de Silva & Santos, 2007).

Quando chegam até os corpos d'água, os pesticidas provocam a contaminação desses locais, causando sérios danos a organismos não-alvo, incluindo os peixes, o que pode resultar em alterações significativas em determinados processos bioquímicos e fisiológicos desses animais (MAHTTIESSEN et al., 1995; STORM et al., 2000; SHWETA et al., 2007). Isto ocorre porque os peixes são particularmente sensíveis à influência de pesticidas, uma vez que eles são capazes de absorver e reter esses xenobióticos dissolvidos na água, via transporte ativo ou passivo. As alterações fisiológicas observadas em peixes não constituem apenas uma resposta às baixas concentrações ambientais de pesticidas, mas também proporcionam uma compreensão desses poluentes em termos biológicos e demonstram um modelo de toxicidade para vertebrados, incluindo o homem (SANCHO et al., 2010).

Tebuconazole é um fungicida pertencente ao grupo dos triazóis, amplamente utilizado em lavouras de arroz (Figura 2). De acordo com seu potencial de periculosidade ambiental, o tebuconazole enquadra-se na classe II, sendo

considerado muito perigoso ao meio ambiente e altamente tóxico para organismos aquáticos, segundo o IBAMA. Em relação à classificação toxicológica, enquadra-se na classe III, sendo considerado medianamente tóxico. Possui ação sistêmica e persistência de 20-25 dias no ambiente. A formulação comercial Folicur[®] é classificada como uma substância tóxica para organismos aquáticos e pode causar efeitos adversos, em longo prazo, no ambiente aquático (BAYER CROPSCIENCE LIMITED, 2005). A literatura indica que fungicidas triazóis, bem como outros relacionados imidazóis, são usados para proteção de cereais. Seu efeito fungicida é resultado da inibição do citocromo P450 (CYP450) dependente da enzima C14 α -esterol-demetilase, a qual promove a demetilação do lanosterol, um intermediário na biossíntese do ergosterol e interfere com a síntese de esteróis, que são essenciais para a constituição normal das membranas celulares.

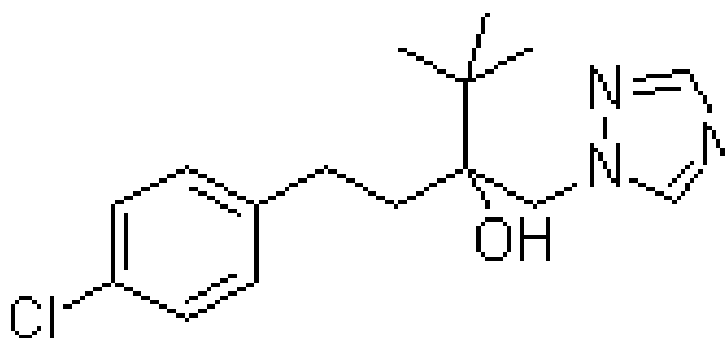


Figura 2 – Estrutura química do tebuconazole.

3.2 Carpa (*Cyprinus carpio* L. 1758)

Os peixes parecem possuir as mesmas vias metabólicas que as espécies de mamíferos para lidar com a toxicidade de agentes endógenos e exógenos. Por isso, é importante analisar os efeitos tóxicos de pesticidas em peixes, uma vez que estes constituem um importante elo na cadeia alimentar e sua contaminação por esses xenobióticos provoca um desequilíbrio no sistema aquático. Além disso, os peixes também constituem uma parte importante da alimentação humana (ORUÇ & USTA, 2007).

A carpa (*Cyprinus carpio*) é um peixe teleósteo da família Cyprinidae (Figura 3). Originária da Europa Oriental e da Ásia Ocidental, a carpa foi introduzida no

Brasil, mais precisamente no estado de São Paulo, somente em 1904 (CESP, 1985). Características como rusticidade, resistência a diferentes temperaturas e facilidade de criação, fazem da carpa um dos peixes mais importantes cultivados no mundo todo e indiscutivelmente uma das principais espécies utilizadas em aquacultura (VANDEPUTTE, 2003). Por tratar-se de um peixe rústico, onívoro, o que permite fácil adaptação aos mais diferentes tipos de alimentos, essa espécie torna-se bastante atrativa para cultivos intensivos e em larga escala devido ao manejo relativamente simples (CASTAGNOLLI & CYRINO, 1986).

É um peixe de águas paradas e quentes, embora consiga se adaptar a temperaturas extremamente baixas. Entretanto, seu desenvolvimento ótimo se dá com temperatura média de 28°C, com níveis de oxigênio entre 7 e 9 mg/L (CESP, 1985; GALLI & TORLONI, 1989). Uma vez que a carpa possui a capacidade de resistir a uma ampla faixa de temperatura, sua dispersão ocorreu por várias regiões e por isso, hoje são denominados animais cosmopolitas (MOREIRA et al., 2001). A fácil dispersão fez com que surgissem várias raças, com algumas características específicas, de acordo com a região. A carpa húngara (linhagem da carpa espelho procedente da Hungria), por exemplo, possui um pequeno número de escamas, dispostas em três fileiras, predominando ao longo da região dorsal, sobre a linha lateral e na região ventral do peixe (CASTAGNOLLI, 1992; MOREIRA et al., 2001).



Figura 3 – Exemplar de *Cyprinus carpio*

No Rio Grande do Sul, as carpas (várias espécies) constituem o grupo de peixes mais cultivados (BALDISSEROTTO, 2008) e empregados em sistemas de policultivo (SILVA et al., 2006), visando aumentar a produtividade por uma utilização mais eficiente dos recursos ecológicos disponíveis no meio aquático. Além disso, essa espécie de peixe tem sido empregada em pesquisas para adoção do sistema

de rizipiscicultura no Rio Grande do Sul, uma vez que já existem estudos relatando um aumento no rendimento do arroz irrigado quando cultivado em consórcio com peixes em outros países (MARCHEZAN et al., 2006).

3.3 Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

No que diz respeito às funções neurais, enzimas de interesse são as colinesterases, sendo que dois tipos são reconhecidos: em primeiro lugar, a acetilcolinesterase, que apresenta alta afinidade pela acetilcolina e, em segundo lugar, a butirilcolinesterase, com afinidade para butirilcolina. Em cérebro de peixe encontramos apenas acetilcolinesterase, enquanto que o tecido muscular contém tanto acetilcolinesterase quanto butirilcolinesterase (STURM et al., 2000).

A acetilcolinesterase catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em colina e acetato (Figura 4), desempenhando um papel central na regulação dos níveis adequados desse neurotransmissor no sistema nervoso central, nas junções neuromusculares e nas sinapses simpáticas e parassimpáticas (SANCHO et al., 2000). A atividade desta enzima vem sendo usada como indicador de toxicidade de pesticidas carbamatos e organofosforados (YI et al., 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010), que são conhecidos por inibirem a AChE de maneira reversível (carbamatos) ou irreversível (organofosforados).

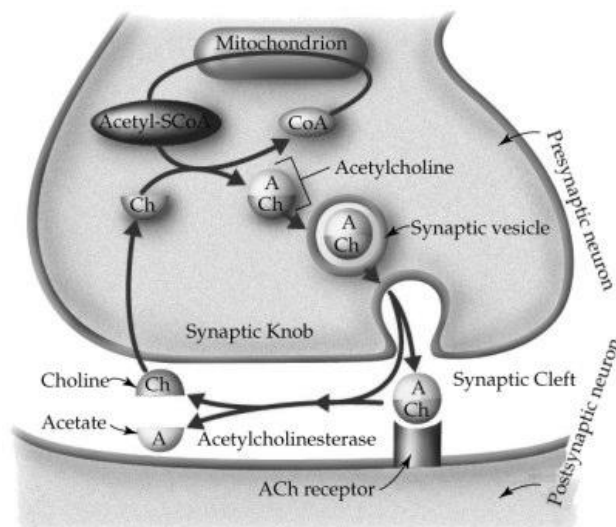


Figura 4 – Degradação da acetilcolina em colina e acetato pela AChE. Disponível em: http://www.fisfar.ufc.br/v2/graduacao/arquivo_aulas/aula_sna.pdf. Acesso em 15 maio 2010.

Quando ocorre inibição da AChE, o neurotransmissor acetilcolina não é hidrolisado nas sinapses nervosas e nas junções neuromusculares, causando um acúmulo anormal de acetilcolina nesses sítios, o que leva a uma estimulação excessiva dos receptores do neurotransmissor (ROEX et al., 2003). Conseqüentemente, isso pode provocar sintomas de neurotoxicidade, identificados por alterações comportamentais como hiperatividade, asfixia e finalmente a morte.

Em peixes, estudos têm demonstrado que a redução na atividade da AChE pode afetar a locomoção e o equilíbrio em organismos expostos a pesticidas e pode impedir a alimentação, os reflexos e o comportamento reprodutivo (SAGLIO & TRIJASSE, 1998; BRETAUD et al., 2000; MIRON et al., 2005). Neste sentido, torna-se importante investigar até que ponto carpas expostas ao fungicida tebuconazole têm a atividade da AChE afetada e quais são os efeitos decorrentes dessa exposição sobre o comportamento desses animais, uma vez que, tendo seus movimentos natatórios prejudicados, os peixes poderão apresentar maior vulnerabilidade às presas quando em seu habitat natural.

3.4 Estresse oxidativo

Para os organismos aeróbios o oxigênio é uma molécula fundamental utilizada na produção de energia, através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Nas células aeróbicas, durante o metabolismo normal, particularmente como um resultado do metabolismo oxidativo na membrana mitocondrial, são geradas EROs como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, entre outras (ZHANG et al., 2004). Esses intermediários, assim como espécies reativas de nitrogênio, podem prejudicar a célula levando a um estado conhecido como estresse oxidativo.

Estresse oxidativo é definido como uma perturbação do equilíbrio entre componentes pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, gerando potencial dano. Ele é resultado de um de três fatores: (1) aumento na geração de EROs, através da acumulação de intermediários reativos; (2) prejuízo do sistema de defesa antioxidante (inibição de enzimas antioxidantes, depleção de antioxidantes não-enzimáticos); (3) incapacidade para reparar dano oxidativo (ALY et al., 2010).

Agentes xenobióticos, incluindo os pesticidas, podem induzir estresse oxidativo uma vez que têm o potencial de produzir EROs que superam a proteção conferida por mecanismos de defesa antioxidante, levando assim, a dano oxidativo, atingindo macromoléculas incluindo DNA, proteínas e lipídios (Figura 5). A produção de EROs e o consequente dano oxidativo pode ser um importante mecanismo de toxicidade em organismos aquáticos que vivem em ambientes receptores de água contaminada (LIVINGSTONE et al., 2001).

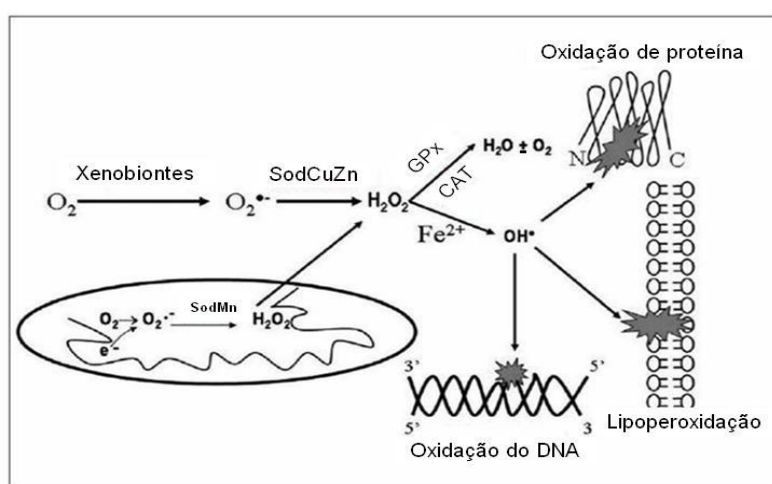


Figura 5 – Dano ao DNA, lipídios e proteínas por EROs. (Adaptado de Trevisan, 2008).

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

Peroxidação lipídica é um complexo processo resultante de reações de radicais livres com membranas biológicas, as quais são ricas em ácidos graxos poliinsaturados. Nesse processo, são formados hidroperóxidos lipídicos os quais decompõem ligações duplas de ácidos graxos insaturados e destroem a membrana lipídica (ORUÇ & USTA, 2007). Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos, como etano e

pentano, e os aldeídos, como o MDA. Este, por sua vez, é bem caracterizado por ser um produto da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados podendo reagir com o TBA produzindo um intermediário colorido que serve como medida dos níveis de TBARS, indicando a ocorrência de peroxidação lipídica (ALMROTH et al., 2005).

O processo de peroxidação lipídica tem influência sobre a fluidez da membrana, bem como a integridade de biomoléculas associadas à membrana, como proteínas e colesterol. Uma vez que esses lipídios, em peixes e outros organismos, estão justapostos à cadeia transportadora de elétrons, eles tornam-se alvos de radicais de oxigênio, que podem causar danos ao organismo. Os lipídios altamente oxidáveis, por sua vez, podem atacar proteínas próximas, formando um excesso de proteína carbonil (ALMROTH et al., 2005).

A formação de grupos carbonil, que se correlacionam diretamente com danos causados às proteínas, também pode ocorrer pelo aumento de EROs que atuam sobre grupos amino das proteínas, alterando sua estrutura e função (ALMROTH et al., 2005). Proteína carbonil também pode se formar através de mecanismos secundários, como resultado de reações dos radicais livres com outros constituintes celulares como lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (GRUNE, 2000).

A modificação oxidativa de proteínas além de ser uma dentre muitas conseqüências do estresse oxidativo, é apontada como valioso biomarcador de exposição a pesticidas (PARVEZ & RAISUDDIN, 2005). A formação de derivados carbonílicos é irreversível, causando alterações conformacionais, diminuição da atividade catalítica de enzimas e, finalmente, resultando em degradação de proteínas por proteases, devido à maior suscetibilidade (ALMROTH et al., 2005).

3.5 Sistema de defesa antioxidante

Os organismos aeróbios têm desenvolvido, através de processos evolutivos, mecanismos de defesa antioxidante destinados a prevenir danos celulares provocados por EROs (VALAVANIDIS et al., 2006). Para combater o estado de estresse oxidativo resultante, dentre outras maneiras, da exposição a pesticidas, a célula possui uma série de defesas capazes de evitar e/ou combater os efeitos

deletérios de EROs geradas. Essas defesas constituem o sistema de defesa antioxidante, e podem ser produzidas endogenamente ou ser adquiridas pela dieta.

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

A SOD (EC 1.15.1.1) constitui uma importante defesa antioxidante e pode ser encontrada tanto no citosol (CuZn-SOD) quanto no interior da mitocôndria (Mn-SOD). Essa enzima catalisa a transformação do $\bullet\text{O}_2^-$, convertendo-o em oxigênio e peróxido de hidrogênio (NORDBERG & ARNÉR, 2001; BARREIROS et al., 2006). Embora a atuação do ânion superóxido como oxidante direto seja irrelevante, uma vez que é pouco reativo e é eliminado pela SOD, ele pode auxiliar na produção do radical $\bullet\text{OH}$, o mais deletério ao organismo, através da reação de Haber-Weiss (KEHRER, 2000).

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

A GST (EC 2.5.1.18) é uma enzima que atua no processo de biotransformação, catalisando a conjugação de uma variedade de metabólitos, incluindo xenobióticos e produtos de lipoperoxidação com GSH, transformando o composto tóxico em uma forma facilmente excretável (MODESTO & MARTINEZ, 2010). Considerando sua função na detoxificação do organismo, um papel fundamental dessa enzima obviamente é a defesa contra o estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003).

Entre os antioxidantes não-enzimáticos está o tripeptídeo glutathiona em sua forma reduzida (GSH), que atua como o principal antioxidante na célula e como co-fator para ação das enzimas GST e GPx (MARAN et al., 2009; MODESTO &

MARTINEZ, 2010). Esse importante antioxidante ocorre naturalmente no organismo, prevenindo danos causados por radicais livres e auxiliando no processo de detoxificação, ligando-se a químicos. Durante um estresse oxidativo moderado, os níveis de GSH podem aumentar como uma resposta adaptativa, por meio de um aumento na sua síntese. Entretanto, um estresse oxidativo severo pode suprimir os níveis de GSH devido a uma falha nos mecanismos adaptativos (ZHANG et al., 2004). Além disso, a GSH é consumida por enzimas para detoxificar os peróxidos produzidos devido ao aumento da peroxidação lipídica (ALY et al., 2010).

O ácido ascórbico ou vitamina C, por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos, sendo comumente encontrado em sua forma ionizada – o ascorbato –, atuando como agente redutor no organismo. Assim, ele pode ser oxidado pela maioria das EROs que são formadas nos tecidos, convertendo-as em espécies inofensivas. Dessa maneira, pode-se concluir que o ascorbato age como antioxidante *in vivo*, uma vez que é capaz de amenizar alguns efeitos tóxicos dos oxiradicais (SAYEED et al., 2003; BARREIROS et al., 2006).

3.6 Parâmetros metabólicos

A exposição de peixes a determinado pesticida pode causar inúmeros efeitos bioquímicos e fisiológicos, dependendo do composto utilizado, o tempo de exposição, a qualidade da água, bem como a espécie animal. Como resultado da presença de poluentes no meio aquático, além do sistema antioxidante enzimático e não-enzimático, alguns parâmetros metabólicos podem estar alterados. Assim que um tóxico é absorvido pelos organismos aquáticos, estes podem apresentar diferentes comportamentos, que podem ser tanto respostas adaptativas ou um mecanismo de toxicidade (BEGUM, 2004).

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

organismo e, em última instância, sobre determinada população (SANCHO et al., 2000).

Na maioria das vezes, um estressor químico induz mudanças compensatórias no metabolismo energético dos organismos. Considerando que a maior parte da energia é usada para processos vitais como crescimento, reprodução e metabolismo basal, o aumento de energia despendida para lidar com o estresse poderá levar a uma redução nas reservas energéticas (SANCHO et al., 2009). Em uma situação de estresse, os organismos geralmente necessitam de uma demanda energética maior, a qual pode ser obtida através da quebra de glicogênio hepático e muscular e aumento da glicose sanguínea. Dessa forma, as concentrações de glicogênio e glicose podem refletir o estado metabólico dos tecidos (CATTANI et al., 1996). Sob condições de hipóxia, o lactato é o produto final da glicólise, assim, a oxidação anaeróbia do substrato favorece o aumento da demanda energética em peixes (CRESTANI et al., 2006). Proteínas são os maiores constituintes no metabolismo dos animais, atuando na arquitetura e fisiologia da célula. Além disso, estão envolvidas na adaptação fisiológica do organismo a agentes tóxicos, os quais podem provocar mudanças no metabolismo dessas moléculas como estimulação da síntese ou da quebra (DE SMET & BLUST, 2001; CRESTANI et al., 2006).

Estudos de toxicologia, envolvendo a exposição de pesticidas, mostram que as alterações nas atividades das enzimas refletem diretamente distúrbios metabólicos e dano celular em órgãos específicos (CASILLAS et al., 1983). Além disso, a avaliação de parâmetros metabólicos é importante por suas alterações surgirem antes dos sintomas clínicos, produzidos por substâncias tóxicas, tornar-se aparentes em um organismo (RAO, 2006). Por esta razão, é importante investigar possíveis alterações em parâmetros gerais referentes ao metabolismo de carboidratos como glicogênio, glicose e lactato, bem como ao metabolismo protéico, mensurando os níveis de proteína, aminoácidos e amônia em carpas expostas ao fungicida tebuconazole, uma vez que pouco se sabe sobre a toxicidade deste pesticida sobre aquela espécie de peixe.

4 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

4.1 Manuscrito I

Tebuconazole-mediated toxicity in *Cyprinus carpio*: LC₅₀-96 h determination and oxidative stress occurrence

Cândida Toni, Daiane Ferreira, Marcos Paulo Damaren Borges, Leonardo José Gil Barcellos, Vania Lucia Loro.

O presente manuscrito foi submetido à revista Aquaculture.

Tebuconazole-mediated toxicity in *Cyprinus carpio*: LC₅₀-96 h determination and oxidative stress occurrence

Cândida Toni^a, Daiane Ferreira^b, Marcos Paulo Damaren Borges^c, Leonardo José Gil Barcellos^c, Vania Lucia Loro^{a*}.

^a Laboratório de Bioquímica Toxicológica e Adaptativa de Peixes, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.

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

^c Universidade de Passo Fundo, Curso de Medicina Veterinária, Campus Universitário do Bairro São José, Caixa Postal 611, CEP 00001-970, RS, Brazil.

Corresponding Author:

(*) Dr. Vania Lucia Loro.

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55 –220-9456

Fax: 55 (55) 220-8240

E-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

Fish cultivated next to agricultural areas where pesticides are applied can undergo biochemical and physiological changes resulting from xenobiotics contamination. The aim of this research is to determinate the lethal concentration (LC₅₀ - 96 hours) of fungicide tebuconazole for carp (*Cyprinus carpio*) and also to investigate the occurrence of oxidative stress. Whole-body levels of thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) and protein carbonyl were determined; enzymes activities such as acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) were measured. It was verified non-enzymatic antioxidants levels glutathione reduced (GSH) and ascorbic acid (AsA), as well as it were evaluated metabolic parameters of fish. The LC₅₀-96 h found in this investigation was 2.37 mg/L. Fish exhibited significant increase of TBARS levels in all concentrations used while the enzymatic and non-enzymatic antioxidants were decreased. Among the metabolic parameters, glycogen and glucose increased at 1.5 mg/L concentration; protein levels decreased at 2.0 and 2.5 mg/L concentrations. In conclusion, the fish health was adversely affected by the exposure to tebuconazole and those changes can compromise animal survival in natural environment. The results indicate TBARS levels like a possible biomarker of exposure to tebuconazole for this specie of fish.

Keywords: lethal concentration, *Cyprinus carpio*, tebuconazole, oxidative stress

1 Introduction

In southern Brazil, aquaculture is still considered a complementary activity that is developed in places such as lakes and reservoirs very close or within agricultural areas (Cericato et al., 2008). The activities of agricultural origin pose risks to groundwater quality and surface water, especially the use of pesticides which, along with many of their metabolic, can cause harm to human health and the environment (Gomes and Spadotto, 2002). In the rice culture, for example, all water is extracted from the crop at least twice a year and deposited in nearby rivers. To make the pest management is used a large number of chemicals or where small quantities of these wastes end up coming in contact with rivers, lakes, streams or water sources used for aquaculture (Van der Oost et al., 2003). The fungicide tebuconazole belonging to the group of azoles is widely used as a fungicide in paddy fields. Tebuconazole (Folicur[®]) is classified as toxic to aquatic organisms that may cause long-term adverse effects in the aquatic environment (Bayer CropScience Limited, 2005).

Toxic effects of pesticides have been studied in several fish species (Monteiro et al., 2006; Ferreira et al., 2010, Toni et al., 2010). Exposure to pesticides can cause oxidative stress in many aquatic organisms, since those contaminants can lead to the formation of reactive oxygen species (ROS) or alter the antioxidant defenses (Monserrat et al., 2007). These highly reactive substances are causing damage to lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids (Sevgiler et al., 2004). The antioxidant system comprises a group of antioxidant enzymes and low molecular weight antioxidants, such as ascorbic acid, reduced glutathione (GSH), and other non-protein thiols (Winston and Di Giulio, 1991). The antioxidant enzymes include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). Glutathione-S-transferases (GST) are from the second phase, which has the objective of detoxifying the enzymes that catalyze the conjugation of GSH with a variety of electrophilic compounds. Acetylcholinesterase (AChE) can be considered an indicator of toxicity after exposure to pesticides. Furthermore, lipid peroxidation and protein carbonyl may also occur in response to oxidative stress (Miron et al., 2008).

The common carp (*Cyprinus carpio*) is one of the most important cultivated fish in the world, and undoubtedly one of the most important aquaculture species. In Rio Grande do Sul, the carps (several species) represent the fish group most

cultivated (Baldisserotto, 2008). For this reason, this fish was chosen for this investigation. The aim of this study is to determinate the lethal concentration (LC_{50-96} h) of tebuconazole for *C. carpio*, as well as to analyze the fish behavior during an exposure period of 96 hours, symptomatic and physiological characteristics when exposed to the fungicide. Additionally, it was evaluated the oxidative stress parameters (lipid peroxidation and protein carbonyl), the effects of fungicide on enzymatic and non-enzymatic antioxidants in fish, and also metabolic parameters.

2 Materials and methods

2.1 Test animals

Carp (*Cyprinus carpio*) weighting 2.0 ± 0.5 g and measuring 3.0 ± 0.1 cm were obtained from Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária at Universidade de Passo Fundo (RS, Brazil). Fish were acclimated for one week to laboratory conditions before the start of the experiments. They were kept in continuously aerated water with a static system and a natural photoperiod (12-h light/12-h dark). During the acclimation period, the fish were fed twice a day with commercial extruded food at 5% of body weight (42% crude protein). This work and experiments were approved by de board on experimentation on animals of the Federal University of Santa Maria. Reference number: 23081.015531/2009-96.

2.2 Chemicals

Commercial formulation of the tebuconazole fungicide [1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentane-3-ol]. The trade name used in the Brazilian Market is Folicur[®]200EC (BASF) at 200 g i.a./L. Acethylthiocholine (ASCh), 5,5'dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1-chloro-2,4 dinhitrobenzene (CDNB), bovine serum albumin, Triton X-100, hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), 2- thiobarbituric acid (TBA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3 Toxicity testing protocol

Four-day static acute toxicity tests were performed in laboratory to determine the LC₅₀ values of tebuconazole for *Cyprinus carpio*. Fungicide concentrations of 1.0, 1.5, 2, 2.5 and 3.0 mg/L were used. After being acclimated to laboratory conditions fish were randomly distributed in each test aquarium. For each concentration, a group of 10 randomly selected fish was placed in the plastic aquaria (40 L per tank of continuous aerated water). This procedure was repeated three times for each concentration. The experiment was carried out in a static test design without water changes and fungicide replacement. The control carp groups were kept in clean water (without fungicide) as in the experimental sets. During the acute toxicity test (96 h) animals were not fed. The number of dead fish was recorded at 24, 48, 72 and 96 h. Dead fish were removed from the aquaria.

2.4 Biochemical determinations

Finished the toxicity test, surviving fish were anesthetized by administering clove oil. Then were individually homogenized with five volumes of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), using a motor-drive homogenize. Homogenates were centrifuged at 2000g for 10 min and the resulting supernatants were stored (-70°C) until further analysis. All measurements were done in duplicate.

2.4.1 Lipid peroxidation estimation

Lipid peroxidation was estimated by a TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) assay, performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which was optically measured according to Buege and Aust (1978). Aliquots of supernatants (0.25 mL) were mixed with 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.67% thiobarbituric acid 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 5000g for 15 min and optical density was measured by spectrophotometer at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.4.2 Protein carbonyl assay

Supernatants (0.4 mL) were homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 using a glass homogenizer. Protein carbonyl content was assayed by the method described by Yan et al. (1995) with some modifications. Soluble protein (1.0 mL) was reacted with 10 mM DNPH in 2N hydrochloric acid. After incubation at room temperature for one hour in dark, 0.5 mL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing SDS 3.0%), 2.0 mL of heptane (99.5%) and 2.0 mL of ethanol (99.8%) were added sequentially, vortexed for 40s and centrifuged at 10000g for 15 min. Then, the protein isolated from the interface was washed twice by resuspension in ethanol/ethyl acetate (1:1), and suspended in 1 mL of denaturing buffer and the carbonyl content was measured spectrophotometrically at 370 nm. Assay was performed in duplicate and two tubes blank incubated with 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 content was expressed as nmol carbonyl/mg protein.

2.4.3 Acetylcholinesterase (AChE) activity

The AChE (EC3.1.1.7) activity was measured using the method described by Ellman et al. (1961) with some modifications. Aliquots of supernatant (0.1 mL) were incubated at 30°C for 2 min with a solution containing 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.5 and 1 mM DTNB. After the incubation period, the reaction was initiated by the addition of ASCh (0.5 mM). The final volume was 2.0 mL. Absorbance was measured by spectrophotometer (Femto Scan spectrophotometer) at 412 nm during 2 min. Enzyme activity was expressed as μmol of ASCh hydrolyzed/min/mg protein.

2.4.4 Antioxidant enzymes

Catalase (EC1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometer (Nelson and Kiesow, 1972). The assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), 0.05 mL H_2O_2 (0.3 M) and 0.01 mL homogenate. Change of H_2O_2 absorbance in 60 s was measured at 240 nm. Catalase activity was calculated and expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. SOD activity was performed based on inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin as described by Misra

and Fridovich (1972). 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.

2.4.5 Glutathione S-transferase (GST) assay

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

2.4.6 Non-enzymatic antioxidants

Reduced glutathione (GSH) and ascorbic acid (AsA) were studied as non-enzymatic antioxidants. An aliquot the supernatants (1.0 mL) mixed with 1.0 mL 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation. GSH levels were determined by the method of Ellman (1959). Supernatants (0.25 mL) were used for determination with 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 10 mM (DTNB) and phosphate buffer 0.5 mM (pH 6.8). The optical density of reaction product was read at 412 nm on a spectrophotometer and results were expressed as $\mu\text{mol GSH}/\text{g}$ fish. AsA levels were estimated by the method of Roe (1954) with some modifications. Supernatants (0.3 mL) was mixed with 2,4-dinitrophenylhydrazine (4.5 mg mL^{-1}), 0.6 mg mL^{-1} thiourea, CuSO_4 (0.075 mg mL^{-1}) and 13.3% trichloroacetic acid and incubated for 3 h at 37°C. Then H_2SO_4 65% (v/v) was added to the medium. The absorbance was taken at 540 nm and the results expressed as $\mu\text{mol AsA}/\text{g}$ fish.

2.4.7 Protein determination

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

2.4.8 Metabolic parameters

Whole body glycogen was determined by the method described by Dubois et al. (1956) after KOH (6N) and ethanol addition for precipitation of glycogen. Supernatant was used to estimate the protein level according to the method described by Lowry et al. (1951). For lactate, sugar soluble and ammonia determination, the completely deproteinated supernatant was used for lactate determination using the method described by Harrower and Brown (1972), sugar soluble was measured according to Dubois et al. (1956) and ammonia was measured according to Verdouw et al. (1978). For aminoacid quantification, the neutral supernatant homogenates were used for colorimetric aminoacid determination according to Spies (1957).

2.5 Statistical analysis

Probit Analysis Program Version 1.5 was used to calculate the 96 h-LC₅₀ values and its confidence limits (95%). Mean values and standard deviations were calculated for each test group based on the values obtained for each individual fish (n = 6). These results were compared to determine treatment toxic effects by one-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's significant difference tests was used to find differences between experimental group and control group ($p \leq 0.05$).

3 Results

Tebuconazole, at 3.0 mg/L, caused fish death almost immediately following addition to the tank. Lethargy, swimming at the surface and erratic swimming were the main behavioral changes observed throughout the experiment, usually at 2.0 and 2.5 mg/L. The 96-h LC₅₀ obtained for tebuconazole was 2.37 mg/L (confidence interval 2.16 – 2.58).

Whole-body levels of TBARS are shown in Fig.1. The TBARS levels were significantly increased in all tested concentrations, with the superior increase occurred in the highest tested concentration. The exposure to tebuconazole did not cause significant alterations in protein carbonyl contents and AChE activity, when compared with control group (Table 1). CAT and SOD activities were modified after exposure to fungicide (Table 1). Decrease in CAT activity was verified at 1.5 mg/L, while SOD activity decreased at 2.0 and 2.5 mg/L. A significant decrease was observed in the activity of GST at 1.5, 2.0 and 2.5 mg/L (Fig. 2). With respect to non-enzymatic antioxidants, GSH and AsA levels were decreased at concentrations from 1.5 to 2.5 mg/L (Fig. 3 and Fig. 4, respectively).

Table 2 shows results of metabolic parameters obtained in *C. carpio* exposed to tebuconazole. Increase in glucose and glycogen were observed in levels at 1.5 mg/L, when compared with the control group. Protein levels decreased at 2.0 and 2.5 mg/L, while the amino acids levels increased, although no significantly. The others metabolic parameters did not show any change in the concentrations used in this study.

4 Discussion

Acute toxicity of tebuconazole on the *Cyprinus carpio* in the present study resulted in LC₅₀ value at 2.37 mg/L. If we compare these results with those found in the literature with the same fungicide in other fish species, we found out *C. carpio* is more sensitive than *Rhamdia quelen* (5.3 mg/L) (Kreutz et al., 2008) and *Danio rerio* (19.6 mg/L) (Sancho et al., 2010). Different results reflect the specific responses of each fish species to fungicide and the involved detoxification mechanism, which may be more and less efficient, depending on the considered specie.

Previous studies demonstrated that pesticide exposure can induce oxidative stress in different fish species by the generation of free radicals (Modesto and Martinez, 2010; Ferreira et al., 2010; Toni et al., 2010). Lipid peroxidation has been suggested as one of the molecular mechanisms involved in pesticide-induced toxicity and can be determinate through of the TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) levels. In this study, LPO phenomenon was verified in the moment that TBARS levels were increased in all concentrations of fungicide. Ferreira et al. (2010)

observed the same results in *Rhamdia quelen* exposed to tebuconazole for 96 h. Others authors also verified LPO in *Oreochromis niloticus* and *Jenynsia multidentata* after exposure to diazinon and endosulfan, respectively (Üner et al., 2006; Ballesteros et al., 2009). This increase in TBARS levels can be result of the impairment in antioxidant enzymes due to ROS formation that attack the cell membrane, with direct consequences on cell integrity and cell function. Results concerning TBARS showed that a disruption of the pro-oxidant – antioxidant balance in favor of the former of lipid peroxidation occurs in carps exposed to tebuconazole, leading to potential damage.

Among the key enzymes for the detoxification of ROS in all organisms, it is possible to detach superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). These antioxidant enzymes are essential for the conversion of ROS to harmless metabolites and may be increased or inhibited under chemical stress. In our case, exposure to tebuconazole at 2.0 and 2.5 mg/L caused a decrease in SOD activity. These results corroborate with Oruç and Üner (2000), who reported enzyme inhibition after 96 h azinphosmethyl exposure. An increase in the ROS production can cause the inhibition of SOD and other antioxidant enzymes. Additionally, the superoxide radicals by themselves or after their transformation to H₂O₂ cause an oxidation of the cysteine in the enzyme and decrease SOD activity (Dimitrova et al., 1994). This study also demonstrated that the activity of CAT was significantly decreased at 1.5 mg/L. Our results are in agreement with Sayeed et al. (2003) and Ferreira et al. (2010), who reported inhibition in CAT activity after exposure to deltamethrin and tebuconazole, respectively. This decrease in catalase activity could be justified by the flux of superoxid radicals, which have been reported to inhibit CAT activity. Taken together CAT and SOD results indicate a disruption of normal oxidative process indicating an impairment of antioxidant defense system represent here by CAT and SOD.

GST acts in the process of biotransformation, catalyzing the conjugation of a variety of metabolites, including the xenobiotic metabolites and lipoperoxidation products with the GSH, transforming the toxic compound into a more easily excretable one (Modesto and Martinez, 2010). Tebuconazole exposure at 1.5, 2.0 and 2.5 mg/L caused a decrease in GST activity. Others authors reported the same results in different species of fish exposed for pesticides deltamethrin and endosulfan (Sayeed et al., 2003; Ballesteros et al., 2009). The most common response observed

in GST activity is increase activity to trying detoxifying fish tissues to pesticides, however in this study the role of GST seems has been deficient in scavenging ROS, because TBARS levels were found elevated in all concentrations of the fungicide tested and GST showed decrease activity at concentrations tested.

This study shows that the reduced glutathione (GSH) levels were decreased at 1.5, 2.0 and 2.5 mg/L of tebuconazole. In agreement with our results, Monteiro et al. (2006) observed decrease in GSH levels of *Brycon cephalus* exposed to methyl parathion for 96 h. Isik and Celik (2008) reported similar results in *Oncorhynchus mykiss* exposed to same pesticide. GSH and GSH-related processes play a central role in antioxidant defense by contributing to a number of processes, such as free radical scavenging, reduction of peroxides and detoxification of electrophilic compounds (Cnubben et al., 2001). However, under a severe oxidative stress, GSH is consumed by GSH related enzymes, including GST, to detoxify the peroxides produced due to increased lipid peroxidation. Moreover, the GSH levels may be suppressed by the impairment of the adaptive mechanisms and in the context of present study no relation was observed with GST due to reduced enzyme activity observed.

Considering that ascorbic acid (vitamin C) converts ROS in harmless species and its derivatives are unreactive, this acts as *in vivo* antioxidant. It was evaluated the ascorbic acid (AsA) levels in fish exposed to tebuconazole and it was found a decrease in this non-enzymatic antioxidant at 1.5, 2.0 and 2.5 mg/L concentrations. Contrary to our results, Sayeed et al. (2003) related increase in AsA levels of *Channa punctatus* after exposure to deltamethrin. It is known that varied responses to this parameter can be observed in fish exposed to different pollutants (Thomas, 1987), since AsA is an essential factor to ameliorate some of the toxic effects of oxygen radicals. When normal enzymatic defenses are stressed, defenses such as vitamin C prevent the auto-oxidation chain reaction. In this investigation, the inhibition of antioxidants enzymes may have caused increased utilization of AsA by fish, in an attempting to combat ROS leading to depletion of this antioxidant since its regeneration was compromised by GSH levels decreased.

The metabolic parameters are also very useful to assess the fish health conditions after exposure to pesticides. Studies show us that changes in protein and carbohydrate metabolism have occurred in fish that are in stress condition (Crestani et al., 2006; Fonseca et al., 2008; Sancho et al., 2010). In this study, sugar soluble

(glucose) and glycogen levels were increased at 1.5 mg/L of tebuconazole. Similarly, Sancho et al. (2010) reported increase in the glucose levels of *Danio rerio* exposed at same fungicide used in this study. An increase in the glycogen levels were observed in *Rhamdia quelen* after exposure to clomazone (Crestani et al., 2006). As a consequence of tebuconazole exposure, carbohydrate metabolism of *C. carpio* was altered as a physiological strategy played by fish against the toxicant. Glucose increases directly correlate with enhanced levels of glycemia required in fish submitted to stress condition. This leads to the stimulation of processes as lipolysis or proteolysis to use the degraded products as available energy (Sancho et al., 2010). In fact, this study shows a decrease in protein levels at 2.0 and 2.5 mg/L and may indicate a compensatory response to fungicide toxicity. Other authors have related the protein reduction in fish after exposure to toxicants (Gluszczak et al, 2007; Fonseca et al., 2008). In our case, the high energy demands together carbohydrate stores, might have led to the increase of protein catabolism. In summary results presented here led to conclude that tebuconazole was toxic to carps exposed at 96 h. LC-50 96 h showed that this fish is very susceptible to fungicide toxicity.

5 Conclusion

We suggest, due to the results of this investigation, that *C. carpio* is more sensitive to tebuconazole than others fish species. We verified that oxidative stress fungicide-induced caused changes in both enzymatic and non-enzymatic antioxidants. CAT and SOD show depletion in their activities, GSH and AsA also demonstrated levels decreased after exposure to fungicide. TBARS levels were elevated in all concentrations used in this research, which indicates cellular damage. So, we suggest that TBARS measurements could be used as biomarker of exposure to tebuconazole. Furthermore, the metabolites parameters evaluated indicate that under oxidative stress condition, the fish may use the protein catabolism as an alternative energy font.

References

- Baldisserotto, B., 2008. Freshwater fish culture in Rio Grande do Sul State: actual situation, problems and future perspectives. *Ciência Rural* 39, 291-299.
- Ballesteros, M.L, Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 199-205.
- Bayer CropScience Limited, 2005. Environmental Information Sheet Folicur® MAPP number 11278. CPA Guidance Notes version 3. ©EIS.
- 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.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 52, 302-309.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Finco, J., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Anziliero, D., Barcellos, L.J.G., 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 148, 281-286.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Zanden, J., Bladeren, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 141-152.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Lazzari, R., Duarte, M.F., Morsch, V.M., Pippi, A.L., Vieira, V.P., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotox. Environ. Saf.* 65, 48-55.
- Dimitrova, M.S.T, Tsinova, V., Velcheva, V., 1994. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase–catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 108, 43-46.
- Dubois, M.G., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-358.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.* 82, 70-77.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr.V., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Ferreira, D., Motta, A.C., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere* 79, 914-921.
- 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*). *Ecotox. Environ. Saf.* 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. Part C.* 146, 519-524.
- Gomes, M. A . F.; Spadotto, C. A ., 2002. Impacto de defensivos agrícolas na qualidade da água. In: XXV Congresso Paulista de Fitopatologia. Anais, p.30.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Harrower, J.R., Brown, C.H., 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.* 32, 709-711.
- Isik, I., Celik, I., 2008. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pest. Biochem. Physiol.* 92, 38-42.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibit catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M., Marteninghe, A., Silva, L.B., 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciência Rural* 38, 1050-1055.
- Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Miron, D., Pretto, A., Crestani, M., Gluszczak, L., Schetinger, M.R., Loro, V.L., Morsch, V.M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74, 1-5.

- Misra, H.P.; Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294-299.
- Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Lima, J.V., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 146, 221-234.
- 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.
- 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.Ö., Üner, N., 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 127, 291-296.
- Roe, J.H., 1954. In: D. Glick (ed.) *Methods of biochemical analysis*. Interscience, New York, 1, p. 115-139.
- Sancho, E., Villarroel, M.J., Fernández, C., Andreu, E, Ferrando, M.D., 2010. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotox. Environ. Saf.* 73, 370-376.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotox. Environ. Saf.* 56, 295-301.
- Sevgiler, Y., Oruç, E.O., Üner, N., 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pest. Biochem. Physiol.* 78, 1-8.
- Spies, J.R., 1957. Colorimetric procedures for amino acids. *Meth. Enzymol.* 3, 467-477.

- Thomas, P., 1987. Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of striped millet, *Mugil cephalus* Linn., tissues. III. Effects of exposure to oil. J. Fish Biol. 30, 485-496.
- Toni, C., Menezes, C.C., Loro, V.L., Clasen, B.E., Cattaneo, R., Santi, A., Pretto, A., Zanella, R., Leitemperger, J., 2010. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. J. Appl. Toxicol. Doi 10.1002/jat.1530.
- Üner, N., Oruç, E.Ö., 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.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.
- Verdouw, H., Vanechteld, C.J.A., Deckkers, E.M.J., 1978. Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. Water Res. 12, 399-402.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137-161.
- 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.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y., 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. Chemosphere 55, 167-174.

Figure captions

Fig. 1. Levels of TBARS (nmol MDA/mg protein) in *Cyprinus carpio* after exposure to different concentrations of tebuconazole for 96 h. Mean \pm SD; n = 6. * $p \leq 0.05$ respect to the control group.

Fig. 2. Activity of glutathione S-transferase ($\mu\text{mol GS-DNB}/\text{min}/\text{mg}$ protein) in *Cyprinus carpio* after exposure to different concentrations of tebuconazole for 96 h. Mean \pm SD; n = 6. * $p \leq 0.05$ respect to the control group.

Fig. 3. Glutathione levels ($\mu\text{mol GSH}/\text{g}$ fish) in *Cyprinus carpio* after exposure to different concentrations of tebuconazole for 96 h. Mean \pm SD; n = 6. * $p \leq 0.05$ respect to the control group.

Fig. 4. Ascorbic acid levels ($\mu\text{mol AsA}/\text{g}$ fish) in *Cyprinus carpio* after exposure to different concentrations of tebuconazole for 96 h. Mean \pm SD; n = 6. * $p \leq 0.05$ respect to the control group.

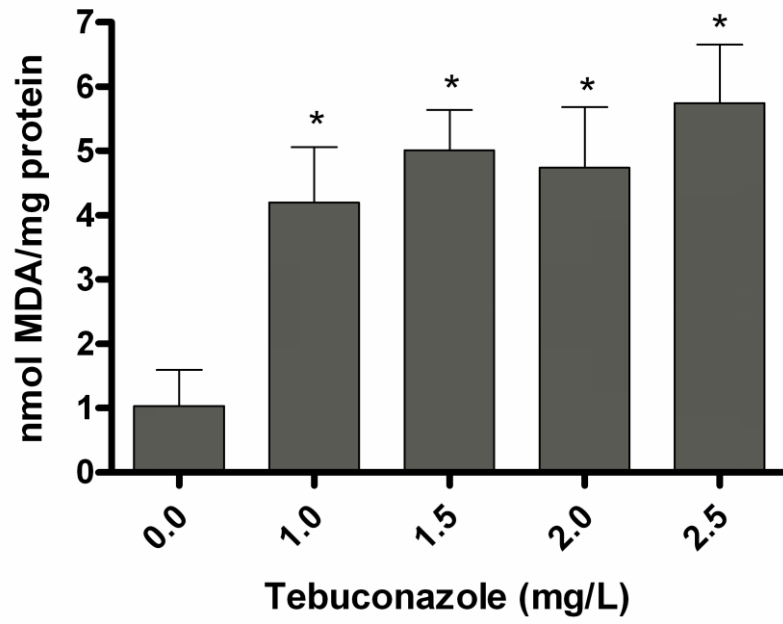


Fig. 1

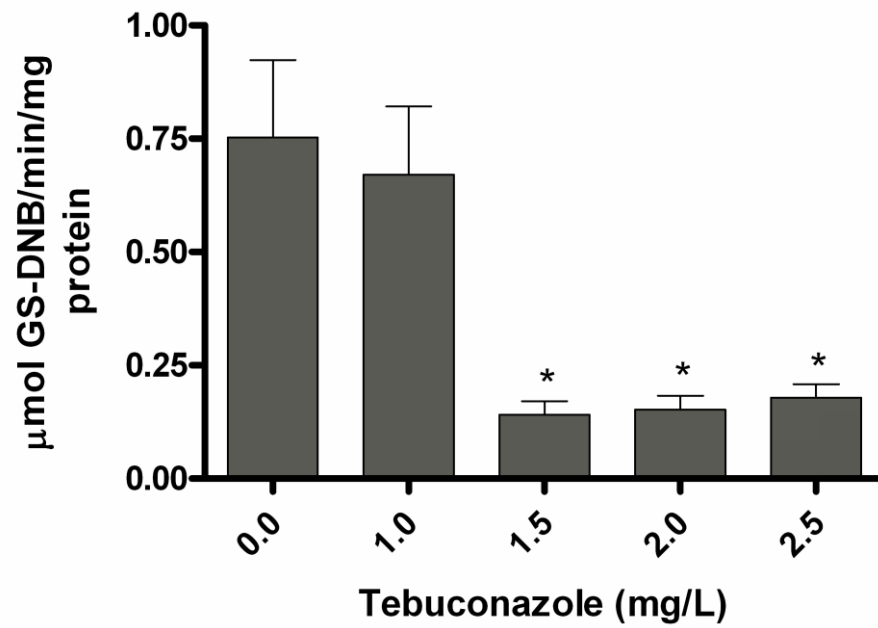


Fig. 2

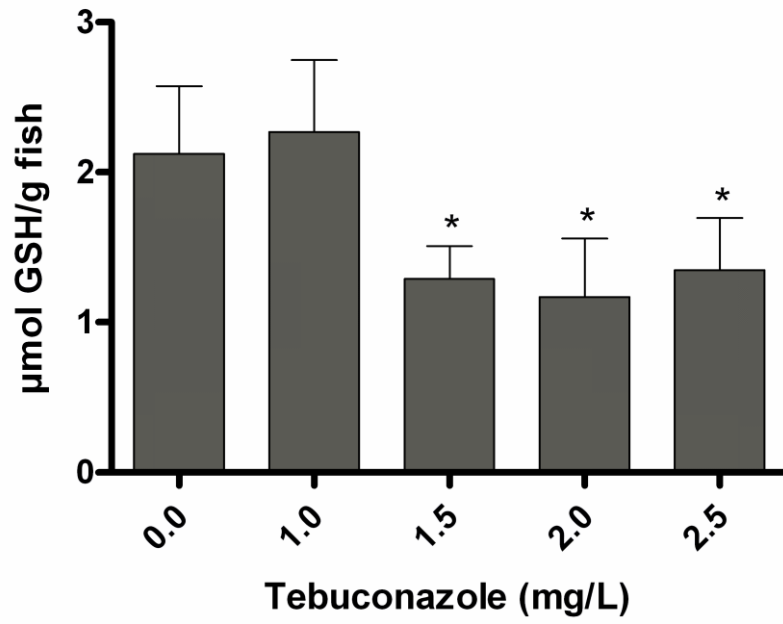


Fig. 3

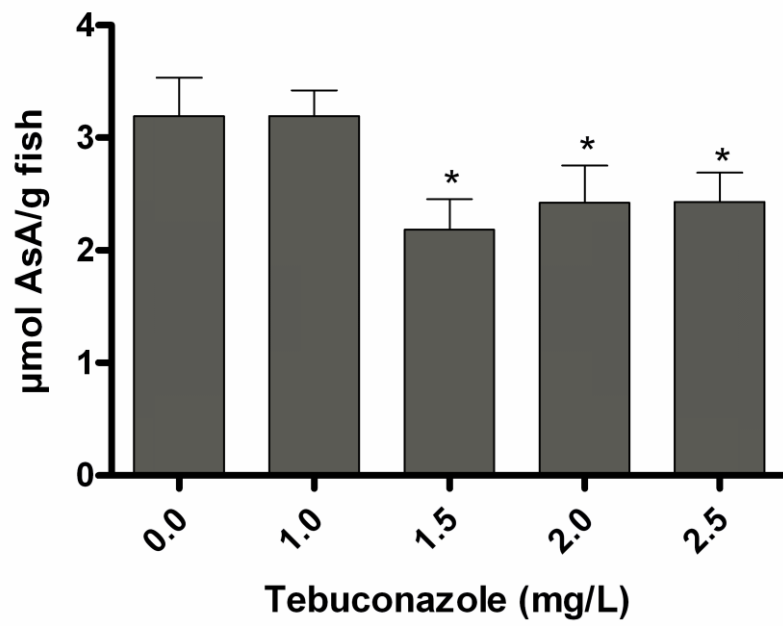


Fig. 4

Table 1 – Whole-body enzymes acetylcholinesterase (AChE – μmol of ASCh hydrolyzed/min/mg protein), catalase (CAT – $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) and superoxide dismutase (SOD – UI SOD/ mg protein) activities and protein carbonyl contents (nmol carbonyl/mg protein) in *Cyprinus carpio* exposed to tebuconazole for 96 hours.

	Control	1.0 mg/L	1.5 mg/L	2.0 mg/L	2.5 mg/L
AChE	0.425 \pm 0.033	0.425 \pm 0.081	0.468 \pm 0.061	0.464 \pm 0.103	0.418 \pm 0.080
CAT	0.074 \pm 0.022	0.070 \pm 0.020	0.028 \pm 0.005*	0.057 \pm 0.020	0.057 \pm 0.014
SOD	13.336 \pm 1.105	12.093 \pm 1.222	14.421 \pm 1.137	9.063 \pm 1.055*	11.360 \pm 0.462*
Protein carbonyl	13.669 \pm 2.212	11.456 \pm 2.681	11.927 \pm 1.279	12.516 \pm 2.558	11.976 \pm 2.903

* Indicate significant difference with control group. Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 6) ($p \leq 0.05$).

Table 2 – Whole-body metabolic parameters in *Cyprinus carpio* exposed to tebuconazole for 96 hours.

	Control	1.0 mg/L	1.5 mg/L	2.0 mg/L	2.5 mg/L
Lactate	11.840±1.932	11.153±1.396	12.939±2.011	11.286±1.434	12.426±2.278
Glycogen	17.160±3.894	17.665±3.668	23.253±3.538*	19.478±3.205	16.832±1.250
Glucose	4.129±0.095	4.166±0.087	4.360±0.115*	4.182±0.051	4.169±0.042
Protein	47.329±2.635	46.289±3.040	48.131±4.933	40.942±4.029*	36.089±2.885*
Amino acids	28.147±4.080	28.367±4.342	30.648±4.544	30.969±2.814	31.068±1.115
Ammonia	2.700±0.441	2.544±0.318	2.951±0.459	2.574±0.327	2.834±0.520

* Indicate significant difference with control group. Data are reported as mean±standard deviation (n = 6) ($p \leq 0.05$).

4.2 Manuscrito II

Exposure to tebuconazole in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carps (*Cyprinus carpio*)

Cândida Toni, Adriana Santi, Charlene Cavalheiro de Menezes, Roberta Cattaneo, Bárbara Estevão Clasen, Renato Zanella, Vania Lucia Loro.

O presente manuscrito foi submetido à revista *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*.

Exposure to tebuconazole in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carps (*Cyprinus carpio*)

Cândida Toni^a, Adriana Santi^a, Charlene Cavalheiro de Menezes^a, Roberta Cattaneo^a, Bárbara Estevão Clasen^a, Renato Zanella^b, Vania Lucia Loro^{a*}.

^a Adaptive Laboratory of Biochemistry, Post-Graduation Program in Biological Science – Toxicologic Biochemistry. Department of Chemistry, University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

^b LARP - Laboratory for Analysis of Pesticide Residues, UFSM, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding Author:

(*) Dr. Vania Lucia Loro.

Departamento de Química

Universidade Federal de Santa Maria

97105.900 - Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55 –220-9456

Fax: 55 (55) 220-8240

E-mail: vanial@smail.ufsm.br

vaniluc@yahoo.com.br

Abstract

Pesticides can affect some biochemical and physiological functions of living organisms. The changes seen in fish and their response to pesticides can be used as an example for vertebrate toxicity. In this study, carps (*Cyprinus carpio*) were exposed to different concentrations of tebuconazole fungicide, by rice field (31.9 µg/L) and laboratory (33.5 and 36.2 µg/L) conditional testing, during a 7 day period. Parameters such as TBARS (thiobarbituric acid-reactive substance) levels, protein carbonyl, catalase, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase activities were studied, using the liver, brain and white muscle of the fish. The field experiment showed that the TBARS levels were increased in all the analyzed tissues. Similarly, the protein carbonyl of the liver and the brain AChE activity increased after 7 days. The laboratory experiment demonstrated that the TBARS levels in the liver were increased in both of the concentration tests. TBARS levels in the muscle increased only by the lowest test concentration. On the other hand, the protein carbonyl was increased only by the highest concentration. The others evaluated parameters did not show significant differences. The results indicate that the tebuconazole exposure from the field and laboratory conditions directly affected the health of the fish, showing occurrence of oxidative stress.

Keywords: fish, oxidative stress, tebuconazole, toxicology.

1. Introduction

The use of pesticides in agriculture is necessary for the protection of cultivated plants, for they express their productive potential. The improper management of pesticides in crops could result in contamination of water sources (Gunningham and Sinclair 2005). Tebuconazole is widely used as a fungicide in paddy fields. The commercial formulation Folicur® is classified as a toxic substance to aquatic organisms that may cause long-term adverse effects in the aquatic environment (Bayer CropScience Limited 2005). Pesticide residue often reaches the aquatic ecosystem and can be transferred through phytoplankton to fish and ultimately to humans. Information about the environmental fate of tebuconazole is scarce (Sancho et al. 2010).

The literature indicates that triazole fungicides, as well as other related imidazoles are used for the protection of cereals. Their fungicidal effect is a result of inhibition of cytochrome P450 (CYP450) dependent C14 demethylation of lanosterol, an intermediate in ergosterol biosynthesis and interfering with the synthesis of sterols, which are essential for the construction of normal cell membranes. In fish, the CYP-mediated steroid metabolism, in addition to xenobiotic metabolism, can be altered (Konwick, et al. 2006).

Fish are particularly sensitive to the influence of pesticides because they are able to absorb and retain dissolved xenobiotic in the water, via active or passive transport. The physiological changes shown in the fish are not only a response to low environmental pesticide levels, but also provide an understanding of pollutants in biological terms, and demonstrates a model for vertebrate toxicity, within the human race as well (Sancho et al. 2010). The common carp (*Cyprinus carpio*) is one of the most important cultured fish in the world, and arguably one of the most important aquaculture species (Vandeputte 2003). In Southern Brazil, this species of fish has been used in polyculture systems where there is a practice of rice-fish culture (Silva et al., 2006).

So we have seen that pesticides can have effects on the biochemical functions, physiological impairment and disturbances in energy metabolism of living organisms, affecting the membrane integrity and possibly inducing generation of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress (Sayeed et al. 2003; Sancho et al., 2009, 2010). ROS are able to attack all biological molecules including

DNA, protein, lipids and lipoproteins, which can cause the depletion of unsaturated fatty acids of the cell membrane, thus, inducing the loss of cell integrity and functional alteration of cell receptors and enzymes (Sepici-Dinçel, et al. 2009).

Lipid peroxidation (LPO) is one of the molecular mechanisms in living organisms involved in pesticide toxicity, as well as the excess of protein carbonyl, which can occur as a result of oxidative stress (Almroth et al. 2005). Furthermore, activity of the antioxidant defense system can be increased or inhibited under chemical stress depending on the intensity and the duration of the stress applied, as well as the susceptibility of the exposed species (Ballesteros et al. 2009; Kavitha and Rao 2009). Glutathione-S-transferase (GST) is an enzyme that acts in the process of biotransformation, catalyzing the conjugation of a variety of metabolites, including the xenobiotic metabolites and lipoperoxidation products with the GSH, transforming the toxic compound into a more easily excretable one (Modesto and Martinez 2010).

Acetylcholinesterase (AChE) activity is a parameter frequently used in environmental monitoring, usually in areas contaminated by pollutants. It is an enzyme that catalyses the hydrolysis of acetylcholine in choline and acetate at synaptic cleft. When AChE activity inhibition occurs in the neurotransmitter acetylcholine (ACh) is not hydrolyzed in the nerve synapses and neuromuscular junctions, causing an abnormal amount of ACh in these areas, which leads to an over activation of the brain and muscular tissues (Roex et al. 2003). Although the effects of the enzyme activation are quite unknown, this had been showed by our laboratory in experiments with herbicides (Miron et al. 2005; Cattaneo et al., 2008).

The purpose of this study was to evaluate the occurrence of lipid peroxidation and the changes in the protein carbonyl content of carps (*Cyprinus carpio*) that were exposed to different concentrations of tebuconazole in field and laboratory conditions. Additionally, the enzymes catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) and acetylcholinesterase (AChE) activities were also studied.

2. Materials and methods

2.1 Fish

Cyprinus carpio weighting 14 ± 1.0 g and measuring 8 ± 1.0 cm 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 a natural photoperiod (12-h light/12-h dark). During the acclimation period the average of water parameters were as follow: temperature $23.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$, pH 6.7 ± 0.2 units, dissolved oxygen 6.5 ± 2.0 mg/L, nonionized ammonia 0.7 ± 0.01 $\mu\text{g/L}$, nitrite 0.05 ± 0.01 mg/L.

After the acclimation period fish were divided into two groups: one group was transferred to field ponds and other group was transferred to laboratory tanks. Thus the study was carried out two different experimental conditions: rice field and laboratory, both for duration of 7 days. The fish were fed during the acclimation and experimental periods, once a day, with commercial fish pellets (42% crude protein, Supra, Brazil). This work and experiments were approved by de board on experimentation on animals of the Federal University of Santa Maria. Reference number: 23081.015531/2009-96.

2.2 Chemicals

Commercial formulation of the tebuconazole fungicide [1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentane-3-ol]. The trade name used in the Brazilian Market is Folicur[®]200EC (BASF) at 200 g i.a./L that was used in the experiment. Acethylthiocholine (ASCh), 5,5'dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1-chloro-2,4 dinhitrobenzene (CDNB), bovine serum albumin, Triton X-100, hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), 2- thiobarbituric acid (TBA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3 Experimental design

2.3.1 Field experiment

The fish were allocated into 2 groups (into triplicates) of 5 animals distributed per tank. There were three control tanks and three treatment tanks, 15 fish per group. One group was the control fish (not exposed to the fungicide), and the other group was the exposed fish to the fungicide, with initial concentration corresponding to 31.9

µg/L during a 7 day period. The concentration of fungicide used in this experiment corresponds to concentration recommended for growing rice. The control fish were in tanks with separate water supply of the fish in the treatment tanks, but the conditions and place of the tanks were mostly the same for both groups. During the experiment in the paddy field, the fish were trapped and submerged in cages, measuring 0.30 m (diameter) x 1.05 m (length). During the experimental period in the rice field, the average water parameters were as follows: temperature $24 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, pH 6.5 ± 0.2 units, dissolved oxygen 6.21 ± 2.0 mg/L, nonionized ammonia 0.8 ± 0.01 µg/L, nitrite 0.06 ± 0.01 mg/L. After 7 days of exposure to the fungicide, the fish were killed by punching the spinal cord (behind the opercula) and then the tissues (brain, liver, and white muscles) were submitted for collection.

2.3.2 Laboratory experiment

The fish were allocated into three experimental groups (in triplicate) of 5 animals distributed into 40 L tanks, with 15 fish per group, and were exposed to the exact same fungicide as the fish from the field experiment. The first group was considered as a control group (not exposed to fungicide). The second group was exposed to initial concentration of 33.5 µg/L of the fungicide. The third group was exposed to initial concentration of 36.2 µg/L. Each group remained with the same experimental conditions for a period of 7 days. The fungicide concentration in the water was monitored on the first and seventh day of the experiment and was also analyzed by the High Pressure and Liquid Chromatography (HPLC), in both experimental conditions (field and laboratory). During the experimental period in the laboratory the average water parameters were as follows: temperature $22.1 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, pH 6.7 ± 0.2 units, dissolved oxygen 6.3 ± 1.0 mg/L, nonionized ammonia 0.6 ± 0.01 µg/L, nitrite 0.04 ± 0.01 mg/L. After 7 days of exposure to the fungicide, the fish were killed by punching the spinal cord (behind the opercula) and then the tissues (brain, liver, and white muscles) were submitted for collection.

2.4 Lipid peroxidation estimation assay

Lipid peroxidation was estimated by a TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) assay, performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-

thiobarbituric acid (TBA), which was optically measured according to Buege and Aust (1978). Liver, muscle and brain (50-250 mg) were homogenized in a phosphate-K⁺ buffer (20 mM) and thus one aliquot (250-400 μ L) was medley with TCA 10% and 0.67% thiobarbituric acid 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 5,000g for 15 min and optical density was measured by spectrophotometer at 532 nm. TBARS levels were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.5 Protein carbonyl assay

The liver tissue (60 mg) was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 using a glass homogenizer. Protein carbonyl content was assayed by the method described by Yan et al. (1995) with some modifications. Soluble protein (1.0 mL) was reacted with 10 mM DNPH in 2N hydrochloric acid. After incubation at room temperature for one hour in dark, 0.5 mL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing SDS 3.0%), 2.0 mL of heptane (99.5%) and 2.0 mL of ethanol (99.8%) were added sequentially, vortexed for 40s and centrifuged at 10,000g for 15 min. Then, the protein isolated from the interface was washed twice by resuspension in ethanol/ethyl acetate (1:1), and suspended in 1 mL of denaturing buffer and the carbonyl content was measured spectrophotometrically at 370 nm. Assay was performed in duplicate and two tubes blank incubated with 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 content was expressed as nmol carbonyl/mg protein.

2.6 Catalase activity assay

Catalase (EC1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesow 1972). Liver tissue were homogenized in a Potter Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and centrifuged at 10,000g 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 0.01 mL

homogenate. Change of H₂O₂ absorbance in 60 s was measured at 240 nm. Catalase activity was calculated and expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein.

2.7 Glutathione S-transferase (GST) assay

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

2.8 Acetylcholinesterase (AChE) activity assay

The AChE (EC3.1.1.7) activity was measured using the method described by Ellman et al. (1961) and modified by Miron et al. (2005). Brain and muscle tissues (30 mg) were weighted and homogenized in a Potter Elvehjem glass/Teflon homogenizer with sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.2 and Triton X-100 1%. The homogenate was then centrifuged for 10 min at 3,000g at 5°C and the supernatant was used as enzyme source. Aliquots of supernatant (50 and 100 μL) (brain and muscle, respectively) were incubated at 30°C for 2 min with a solution containing 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.5 and 1 mM DTNB. After the incubation period, the reaction was initiated by the addition of ASCh (0.5 mM). The final volume was 2.0 mL. Absorbance was measured by spectrophotometry (Femto Scan spectrophotometer) at 412 nm during 2 min. Enzyme activity was expressed as $\mu\text{mol of ASCh hydrolyzed}/\text{min}/\text{mg}$ protein.

2.9 Protein determination

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

2.10 Statistical procedures

Comparisons between the control group and the exposed group in the field experiment were made by the Student t-test. In the laboratory the data gathered from the experiment was submitted to a one-way analysis of variance (ANOVA) and the treatment records were compared by Duncan's Test ($p \leq 0.05$). The results obtained ($n = 15$) were expressed as a mean \pm standard deviation (SD).

3. Results

3.1 Field experiment

The TBARS values in the different tissues of the carp (*Cyprinus carpio*) are shown in Fig. 1A. After seven days of being exposed to the tebuconazole, the lipid peroxidation phenomenon occurred in all tissues analyzed: liver, brain and white muscle, once the TBARS levels increased, compared to the value of the control group. In the same way, the protein carbonyl content was higher for the fish that were exposed, then in the control group, after the exposure period (Fig. 2A). In addition, in the brain tissue the enzyme AChE activity increased in the group that was exposed to the fungicide, compared with the control group, while the muscle didn't show a significant difference between the two groups (Table 1). CAT and GST activities showed no significant changes (Table 1). Tebuconazole residues were monitored in the water of the rice field system to verify the presence of the active fungicide ingredients in the water (data not shown).

3.2 Laboratory experiment

The Fig. 1B shows that the TBARS tissue levels of the carp (*Cyprinus carpio*) after seven days of being exposed to the tebuconazole. In the liver, there was a significant increase of the TBARS levels for both test concentrations (33.5 and 36.2 $\mu\text{g/L}$) when compared with the control group. In the muscle, the TBARS levels increased only by the lowest test concentration compared with the control group. At the same time, the TBARS levels in the brain showed no change. The protein carbonyl content increased in higher test concentrations (Fig. 2B). The enzymatic activity is shown in Table 1. After seven days of exposure to the fungicide the CAT,

GST, and AChE activities were not significantly changed. Tebuconazole residues were monitored in the water of the laboratory experiment to verify the presence of the active fungicide ingredient in the water (data not shown).

4. Discussion

The pesticides used in the agricultural areas can produce oxidative stress in non-target organisms, reaching fish that live in aquatic ecosystems or around cultivated areas. In this study, the tebuconazole exposure in both experimental conditions (field and laboratory) caused changes in the carp's (*Cyprinus carpio*) metabolism.

After 7 days of exposure to tebuconazole, the lipid peroxidation (LPO) phenomenon was verified in the liver, brain and muscle tissues of the fish exposed in field condition. LPO occurs when free radicals attack the unsaturated fatty acid, causing cell membrane damage, affecting its structure and function. In field experiment, the TBARS levels were increased at all tissue evaluated. These results are in agreement with those obtained by Oropesa et al. (2009) that observed a significant increase of TBARS in fish tissues from the "Molinos de Matachel" reservoir (water containing simazine herbicide) in comparison to levels measured in fish from the reference reservoir.

In the laboratory experiment, the TBARS levels were elevated in the liver and muscle, but not in the brain. The results concerning lipid peroxidation were different in laboratory condition where lipid oxidative damage was observed only in liver and muscle tissues. Although the brain is particularly susceptible to oxidative damage, our findings indicate that the exposure to tebuconazole did not produce a lipid peroxidation in the brain of the fish exposed. Therefore, the lipid peroxidation developed in the brain of the fish exposed in field condition cannot be attributed only by the tebuconazole, but by other factors as well, since the laboratory experiment did not confirm such findings. This can be a result of the tissue-specific response that may occur in organisms exposed to different types of pollutants. In addition, pesticide behavior may be different in accordance to the environment considered. Our results of laboratory are in agreement with Miron et al. (2008) and Sayeed et al. (2003) that

observed increase of TBARS levels in *Leporinus obtusidens* exposed to clomazone during 8 days, and in *Channa punctatus* exposed to deltamethrin, respectively.

In this study, the tebuconazole exposure caused the protein oxidation in fish liver. This was observed by the increase of protein carbonyl contents, in both the field and laboratory conditions. However, in the laboratory this increase occurred only in the higher test concentration. Similarly, Parvez and Raisuddin (2005) demonstrated an increase in the protein carbonyl contents in the liver of deltamethrin-exposed fish, after 7 days of exposure. Protein carbonyl has been used as a biomarker of exposure in fish because when protein carbonylation occurs, protein conformational changes, decreased catalytic activity and breakdown of proteins by proteases also occur (Almroth et al. 2005). As a result of the oxidative stress, proteins could get damaged with subsequent alteration of their functions. The hydroxyl radical (OH•), which is one of the reactive oxygen species generated in the process of leading to oxidative stress, and is considered to be responsible for the forming of carbonyl groups in proteins (Farber and Levine 1986). The increase in the protein carbonyl levels in the fish liver that was exposed to the tebuconazole indicates that normal protein metabolism had changed, resulting in the accumulation of damaged molecules.

The enzyme acetylcholinesterase activity is an important neurotoxic parameter used to evaluate the pesticide toxicity in fish. In this study, only in the field condition brain AChE activity showed response, demonstrating an increase in comparison with control group. Our findings corroborate with Moraes et al. (2009) where imazethapyr and imazapic herbicides increased brain AChE activity in *C. carpio* in a similar rice field condition. The most commonly found effect of pesticide toxicity is the inhibition of enzyme activity. However, different pesticides have shown increase of AChE activity (Miron et al. 2005). This contradictory result could represent fish response against possible stress caused by tebuconazole.

In both experimental conditions of this study, enzymes catalase and glutathione S-transferase activities showed no changes. As found in the literature the activity of antioxidant enzymes may be increased or inhibited under chemical stress depending on the intensity and the duration of the stress applied as well as the susceptibility of the exposed species (Ballesteros et al. 2009). In this study, the response absence of enzymes CAT and GST may have contributed to the increase of the lipids and protein oxidation, evidenced by increase in the lipid peroxidation and protein carbonyl contents, respectively.

The presence of fungicide residues were monitored in both conditions. In the field experiment occurred decrease 17.8% compared with initial concentration of fungicide. In the laboratory condition, loss 12.6% and 26.0% were observed for initials concentrations 33.5 and 36.2 µg/L, respectively. The present results suggest possible fish tissue absorption, since tebuconazole residues were reduced only in water with fish as compared with water without fish (data not show).

In summary, this study has shown that tebuconazole can cause oxidative stress inducing effects on the *Cyprinus carpio* (carp fish) in the rice field and laboratory condition. The enhancement in the TBARS levels and protein carbonyl contents could be associated with the ROS production in fish exposed to fungicide. Our observations led us to conclude that the alterations in the lipid peroxidation and protein carbonyl can be used as potential biomarkers for risk assessment in the aquatic ecosystem, especially near agricultural areas.

References

- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Förlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73, 171-180.
- Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 199-205.
- Bayer CropScience Limited, 2005. Environmental Information Sheet Folicur® MAPP number 11278. CPA Guidance Notes version 3. ©EIS.
- 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.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* 52, 302-309.
- Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., Silveira, F.A., Luz, L., Miron, D.S., Fonseca, M.B., Moraes, B.S., Clasen, B., 2008. 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.* 92, 133-137.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, Jr.V., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Farber, J.M., Levine, R.L., 1986. Sequence of a peptide susceptible to mixed-function oxidation. Probable cation binding site in glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* 261, 4574.
- Gunningham, N., Sinclair, D., 2005. Policy instrument choice and diffuse source pollution. *J. Environ. Law.* 17, 51-81.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Kavitha, P., Rao, J.V., 2009. Sub-lethal effects of profenofos on tissue-specific antioxidative responses in a Euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 1727-1733.

- Konwick, B.J., Garrison, A.W., Avants, J.K., Fisk, A.T., 2006. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol.* 80, 372-381.
- Miron, D., Crestani, M., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno, M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 398-403.
- Miron, D., Pretto, A., Crestani, M., Gluszczak, L., Schetinger, M.R., Loro, V.L., Morsch, V.M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74, 1-5.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Roundup[®] causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294-299.
- Moraes, B.S., Clasen, B., Loro, V.L., Pretto, A., Toni, C., Avila, L.A., Marchesan, E., Machado, S.L.O., Zanella, R., Reimche, G.B., 2009. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. *Ecotoxicol. Environ Saf* (in press) doi:10.1016/j.ecoenv.2009.05.013
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474-478.
- Oropesa, A.L., García-Camero, J.P., Soler, F., 2009. Glutathione and malondialdehyde in common carp after exposure to simazine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 30-38.
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharm.* 20, 112-117.
- Roex, E.W.M., Keijzers, R., Gestel, C.A.M., 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquat. Toxicol.* 64, 451-460.
- Sancho, E., Villarroel, M.J., Andreu, E., Ferrando, M.D., 2009. Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. *Chemosphere* 74, 1171-1178.

- Sancho, E., Villarroel, M.J., Fernández, C., Andreu, E., Ferrando, M.D., 2010. Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotox. Environ. Saf.* 73, 370-376.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 295-301.
- Sepici-Dinçel, A., Benli, A.Ç.K., Selvi, M., Sarikaya, R., Sahin, D., Özkul, I.A., Erkoç, F., 2009. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotox. Environ. Saf.* 72, 1433-1439.
- Silva, L.B., Barcellos, L.J.G., Quevedo, R.M., Souza, S.M.G., Kreutz, L.C., Ritter, F., Finco, J.A., Bedin, A.C., 2006. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South America: Initial growing period. *Aquaculture* 255, 417-428.
- Vandeputte, M., 2003. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. *Aquat. Living. Resour.* 16, 399-407.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- 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.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 TBARS levels (nmol MDA/mg of protein) in brain, liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* exposed to commercial fungicide containing tebuconazole at rice field (A) and laboratory conditions (B) for 7 days. Data represent the mean \pm SD (n = 15). *Indicates significant difference respect to control group ($p \leq 0.05$).

Fig. 2 Protein carbonyl contents in liver of *Cyprinus carpio* exposed to commercial fungicide containing tebuconazole at rice field (A) and laboratory conditions (B) after 7 days. Data represent the mean \pm SD (n = 15). *Indicates significant difference respect to control group ($p \leq 0.05$).

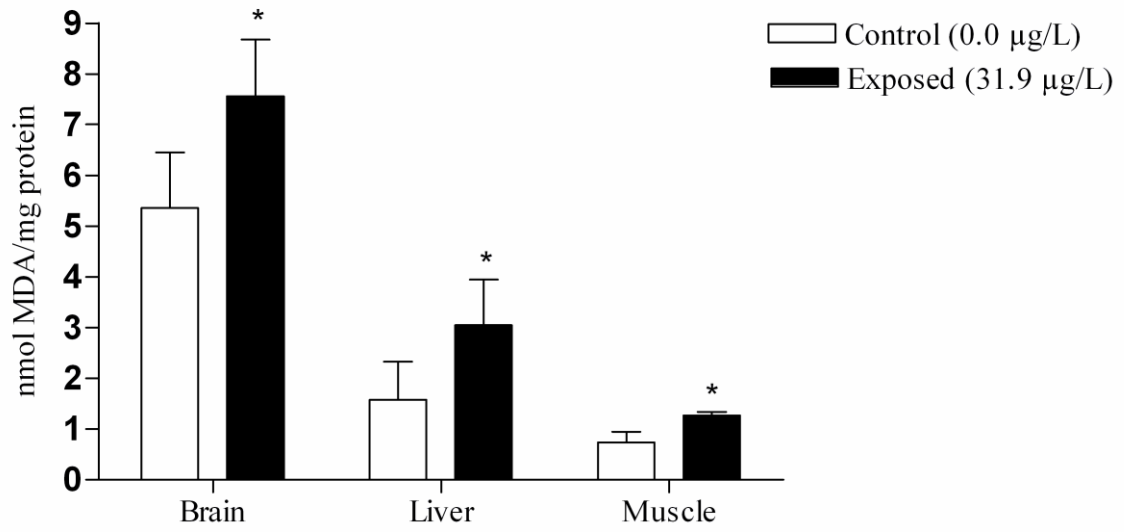


Fig. 1A

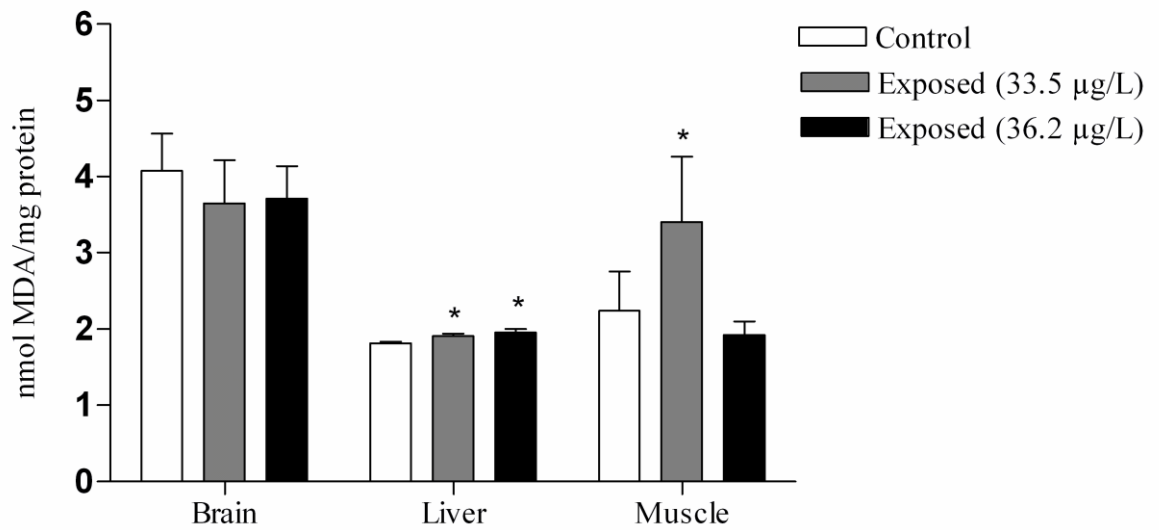


Fig. 1B

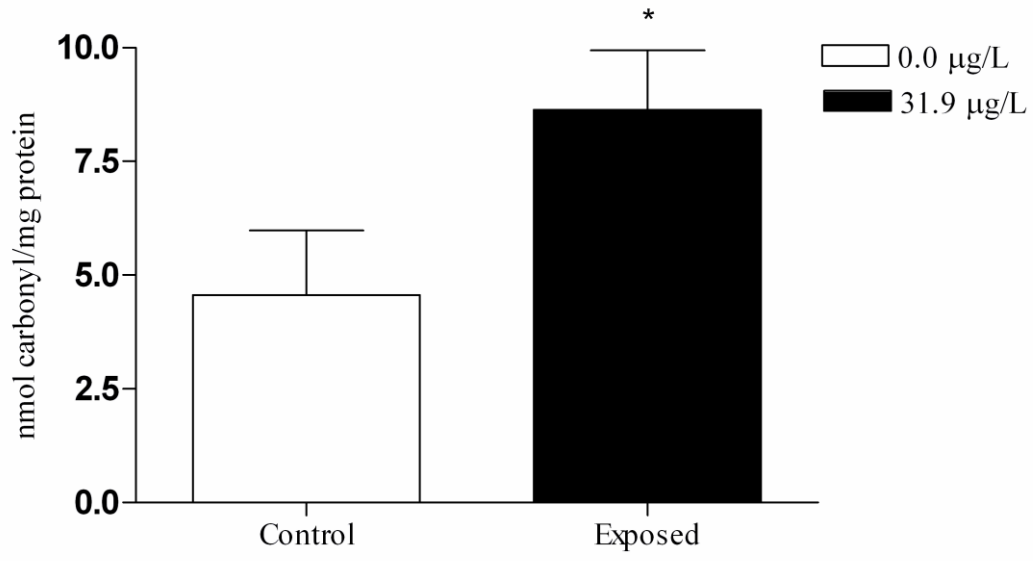


Fig. 2A

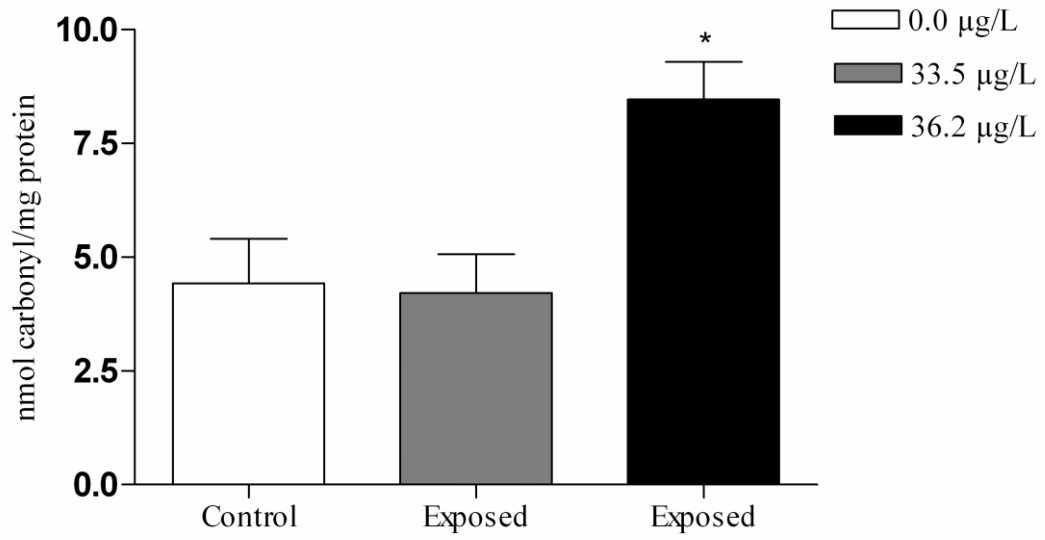


Fig. 2B

Table 1 – Effects of tebuconazole on catalase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein), glutathione S-transferase (μmol GS-DNB/ min/mg protein) and acetylcholinesterase (ASCh hydrolyzed/ min/mg protein) activities in different tissues of *Cyprinus carpio* after 7 days of exposure in field and laboratory conditions. Data represent the mean \pm SD (n = 15).

Enzymes	Tissue	Field experiment		Laboratory experiment		
		Control	Exposed (31.9 $\mu\text{g}/\text{L}$)	Control	Exposed (33.5 $\mu\text{g}/\text{L}$)	Exposed (36.2 $\mu\text{g}/\text{L}$)
CAT	Liver	0.708 \pm 0,01	0.641 \pm 0,23	0.187 \pm 0.06	0.200 \pm 0.05	0.215 \pm 0.06
GST	Liver	0.299 \pm 0,06	0.144 \pm 0,02	0.416 \pm 0.07	0.367 \pm 0.11	0.327 \pm 0.14
AChE	Brain	0.173 \pm 0,02	0.218 \pm 0,02*	0.276 \pm 0.05	0.308 \pm 0.08	0.294 \pm 0.11
	Muscle	0.157 \pm 0,02	0.170 \pm 0,01	0.159 \pm 0.02	0.163 \pm 0.03	0.152 \pm 0.03

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

5 DISCUSSÃO

Considerando que um dos fatores mais importantes que leva à contaminação do ambiente aquático é o uso intensivo de pesticidas na atividade agrícola, neste trabalho foi determinada a CL_{50} (96 h) do fungicida tebuconazole para carpa (*Cyprinus carpio*). Com o crescente aumento da utilização de pesticidas, faz-se necessário, sob um ponto de vista ecotoxicológico, estabelecer os limites de tolerância desse fungicida a uma espécie como a carpa, que apresenta relevante valor comercial, sendo utilizada em sistemas de policultivo e de consórcio arroz-peixe. O teste de toxicidade aguda de tebuconazole para carpa, nesta investigação, determinou como CL_{50} (96 h) a concentração de 2,37 mg/L (2,16 – 2,58). Ao comparar esses resultados com os achados da literatura tratando do mesmo fungicida com outras espécies de peixes, pode-se dizer que *C. carpio* é mais sensível ao tebuconazole que *Rhamdia quelen* e *Danio rerio*, que apresentaram valores para CL_{50} (96 h) 5,3 mg/L e 19,6 mg/L, respectivamente (KREUTZ et al., 2008; SANCHO et al., 2010). A toxicidade de um pesticida sobre determinado organismo pode variar dependendo da formulação utilizada, período de exposição, espécie considerada, que pode ser mais ou menos sensível ao tóxico, de acordo com a eficiência do sistema antioxidante inerente a cada organismo.

Após o teste de determinação da CL_{50} (96 h), os níveis corporais de TBARS mostraram-se elevados em todas as concentrações testadas, indicando a ocorrência de peroxidação lipídica. No segundo experimento, verificou-se que a exposição de carpas ao fungicida tebuconazole, tanto em condições de campo (lavoura de arroz) como em laboratório, durante sete dias, provocou a elevação dos níveis de TBARS em fígado e músculo dos peixes. No cérebro, um aumento significativo foi observado somente na condição de campo. Uma vez que o fenômeno de lipoperoxidação é um dos principais processos induzidos pelo estresse oxidativo, ISIK & CELIK (2008) em estudos prévios, encontraram resultados que corroboram os desta investigação. Os autores acima citados observaram aumento dos níveis de TBARS em fígado de *Oncorhynchus mykiss* expostos a 0,5 ppm dos inseticidas diazinon e metil paration, durante 72 horas. Peroxidação lipídica também foi observada em músculo de *Brycon cephalus* expostos por 96 horas a 2 mg/L de metil paration e de *C. carpio* expostos a

diferentes concentrações de diazinon durante 5 dias (MONTEIRO et al., 2006; ORUÇ & USTA, 2007). Em um experimento de campo em condições semelhantes as deste estudo, TONI et al. (2010) também encontraram elevação dos níveis de TBARS em cérebro de *C. carpio* após 7 dias de exposição ao herbicida bispiribac-sódio. De fato, o fenômeno de peroxidação lipídica pode estar ocorrendo como consequência de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que superou a capacidade do sistema de defesa antioxidante em neutralizá-las, resultando na situação conhecida como estresse oxidativo.

Dentre outras consequências do estresse oxidativo pode ocorrer a carbonilação de proteínas. No primeiro experimento, ou seja, após o teste de toxicidade do tebuconazole (CL₅₀-96h), não foi verificada alteração significativa no conteúdo de proteína carbonil, quando comparado com valores do grupo controle. No segundo experimento, foi verificado aumento no conteúdo de proteína carbonil em fígado de carpas após sete dias de exposição ao tebuconazole, tanto em condições de campo quanto de laboratório. Os resultados deste experimento estão de acordo com os de MIRON et al. (2008), que encontraram aumento de proteína carbonil em fígado de *Leporinus obtusidens* expostos à concentração 0,5 mg/L do herbicida clomazone, durante 8 dias. Resultados semelhantes foram observados por PARVEZ & RAISUDDIN (2005), após a exposição de *Channa punctata* ao inseticida deltametrina (0,75 µg/L), por 7 dias. Os mesmos autores afirmam ainda, que a carbonilação de proteínas pode ocorrer em função de um aumento na quantidade de radicais hidroxila, que é uma das espécies reativas de oxigênio geradas durante o processo que leva ao estresse oxidativo, e que seria responsável pela formação dos grupos carbonil nas proteínas. ALMROTH et al. (2005), sugerem que o aumento de peróxidos lipídicos levaria ao ataque de proteínas próximas, causando a formação de um excesso de proteína carbonil. Neste caso, isso explicaria o concomitante aumento dos níveis de TBARS e de proteína carbonil observado nos experimentos conduzidos em campo e laboratório, durante 7 dias.

Como parâmetro de toxicidade em peixes, foi avaliada a atividade da enzima acetilcolinesterase. No primeiro experimento (CL₅₀-96 h), não se observou alterações significativas na atividade dessa enzima. No segundo experimento, a exposição de carpas ao fungicida tebuconazole em condições de campo levou a um aumento na atividade da AChE em cérebro de peixes, enquanto que no músculo, nesta mesma condição, a atividade da enzima não foi afetada. Da mesma forma, em

laboratório, tanto em cérebro como em músculo, a atividade da AChE não se mostrou alterada. Quando se avalia a atividade da AChE em peixes após a exposição a pesticidas, geralmente encontra-se a diminuição da atividade enzimática (MIRON et al., 2008; FONSECA et al., 2008; MODESTO & MARTINEZ, 2010). Por outro lado, alguns autores reportaram aumento na atividade da AChE após exposição a pesticidas, corroborando com os resultados do presente estudo. Após exporem *C. carpio* ao herbicida bispiribac-sódio, em condições de lavoura de arroz por 7 dias, TONI et al. (2010) observaram um aumento na atividade da AChE cerebral, enquanto que no músculo a atividade enzimática foi diminuída. Em um estudo conduzido em laboratório, CATTANEO et al. (2008) encontraram resultados semelhantes em *R. quelen* expostos ao herbicida 2,4-D, durante 96 horas. Percebe-se, portanto, que não há um padrão de resposta exclusivo de inibição na atividade da AChE após exposição a pesticidas. Diferentes resultados podem ser observados considerando a classe do pesticida usado, o tempo de exposição e as espécies afetadas, que podem responder diferentemente, de acordo com a eficiência do sistema antioxidante, inerente a cada organismo. Considerando que a ativação da AChE em organismos expostos a pesticidas ainda é pouco conhecida, mais estudos são recomendados a fim de se descobrir qual mecanismo pode estar envolvido nesse resultado.

Neste estudo também foi avaliada a atividade da enzima GST, que participa dos processos de biotransformação e detoxificação de xenobióticos. No primeiro experimento, após o teste para determinação da CL₅₀ (96h) do fungicida tebuconazole para *C. carpio*, observou-se uma redução na atividade da GST, em comparação com o grupo controle. No segundo experimento, a atividade enzimática não exibiu alteração significativa nos peixes expostos ao tebuconazole tanto em condições de campo quanto de laboratório, durante 7 dias. A atividade dessa enzima determina a habilidade do peixe em se adaptar a poluentes ambientais como os pesticidas (GADAGBUI et al., 1996), por isso tem sido investigada em estudos que avaliam a toxicidade de pesticidas em peixes (MONTEIRO et al., 2006; KAVITHA & RAO, 2009). Aumento na atividade da GST foi encontrado em *R. quelen* após 96 de horas de exposição a 0,88 mg/L do fungicida tebuconazole (FERREIRA et al., 2010). Contrário a esses resultados, ISIK & CELIK (2008) observaram uma redução da GST em *O. mikiss* expostos ao inseticida metil paration. ORUÇ & ÜNER (2000), por sua vez, relataram que a atividade da GST não foi alterada após a exposição de

Oreochromis niloticus a uma combinação do herbicida 2,4-D e do inseticida azinfosmetil, durante 96 horas. Dado o exposto, constata-se que os efeitos sobre a GST têm sido inconclusivos, mostrando indução, redução ou nenhuma alteração na atividade enzimática. No entanto, a inibição enzimática pode refletir um prejuízo no mecanismo de detoxificação do fungicida, agravando ainda mais a situação de estresse oxidativo em que o peixe se encontra, resultando em dano ao organismo.

A SOD é uma enzima que desempenha um papel crucial na defesa do organismo contra espécies reativas de oxigênio. Ela constitui uma importante defesa contra EROs, dismutando o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Neste estudo, ocorreu redução na atividade da SOD em *C. carpio*, após o teste para determinação da CL_{50} (96h) do fungicida tebuconazole. Semelhante a isso, a exposição de *O. niloticus* a diferentes concentrações (0,3 e 0,6 mg/L) do herbicida oxifluorfen também resultou em atividade diminuída da SOD após 7 dias (PEIXOTO et al., 2006). Além disso, ISIK & CELIK (2008) relataram que os inseticidas metil paration e diazinon causaram redução na atividade da SOD em *O. mikiss* após 72 horas de exposição. Esses resultados corroboram com os achados deste trabalho, comprovando que a exposição a diferentes pesticidas afeta de forma adversa a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD. A inibição da atividade enzimática possivelmente estaria ocorrendo em função de uma produção exacerbada de ânion superóxido – devido à exposição ao fungicida – que se sobrepõe à capacidade da SOD em neutralizar essas EROs. Ou seja, o próprio substrato estaria provocando uma modificação oxidativa, alterando a estrutura e função da enzima e, por conseguinte, levando a sua inativação. Por outro lado, a indução de enzimas antioxidantes pode refletir uma adaptação do organismo ao xenobiótico (DOYOTTE et al., 1997). Neste caso, os resultados do presente estudo, demonstram que o organismo dos peixes expostos ao tebuconazole não foi hábil para se adaptar ao tóxico.

Em relação à atividade da enzima CAT, no primeiro experimento, após o teste de toxicidade do tebuconazole (CL_{50} -96h), foi observada uma redução na atividade da CAT. Corroborando com este resultado, MIRON et al. (2008) também encontrou a atividade da CAT diminuída em fígado de *L. obtusidens* expostos ao clomazone. No segundo experimento, não foi observada alteração significativa em peixes expostos ao tebuconazole por sete dias, seja em condições de campo ou de laboratório. Estes resultados estão de acordo com TONI et al. (2010), que relataram não ter ocorrido

nenhuma alteração significativa na atividade da CAT após a exposição de *C. carpio* ao herbicida bispiribac-sódio, em condições de campo, e MODESTO & MARTINEZ (2010), em *Prochilodus lineatus* expostos ao Roundup[®], em laboratório. A literatura relata que a atividade de enzimas antioxidantes pode estar aumentada ou diminuída após a exposição a pesticidas (BALLESTEROS et al., 2009). Um aumento estaria relacionado a uma resposta adaptativa do peixe na tentativa de se livrar do tóxico, enquanto que a redução da atividade enzimática estaria ocorrendo como consequência de uma falha no sistema de defesa antioxidante. Devido a isso, as espécies reativas de oxigênio não estariam sendo neutralizadas de forma eficiente, o que causaria dano aos lipídios e às proteínas, resultando, respectivamente, no aumento dos níveis de TBARS e de proteína carbonil, relatados previamente.

Os níveis de glutathiona (GSH), principal antioxidante não enzimático celular, diminuiriam nos peixes expostos ao tebuconazole no primeiro experimento (CL₅₀-96h). A GSH, além de participar da defesa antioxidante, está envolvida em processos fundamentais, atuando em conjunto com enzimas. A GST por exemplo converte os xenobióticos em metabólitos menos tóxicos, em conjugação com a GSH. A GPx, por sua vez, usa GSH como co-fator para metabolizar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Sendo assim, uma redução nos níveis de GSH pode reduzir a habilidade celular em destruir os radicais livres, aumentando o potencial oxidativo na célula (ELIA, et al., 2003). Resultados como os da presente investigação foram encontrados em vários tecidos de *C. carpio* expostos ao inseticida diclorvos (HAI, et al., 1997). Da mesma forma, RAO (2006) observou redução nos níveis de GSH em *Oreochromis mossambicus* após 3 e 7 dias de exposição ao inseticida monocrotofos. A literatura relata que essa diminuição de GSH é considerada um biomarcador de estresse ambiental, como observado em peixes estressados por poluentes químicos (PEÑA-LOPIS et al., 2002; KAVITHA & RAO, 2009). De fato, sob um estresse oxidativo moderado, os níveis de GSH podem ser mantidos através de um mecanismo adaptativo, que promove o aumento da sua síntese. No entanto, um estresse oxidativo severo pode suprimir os níveis de GSH devido a uma falha nesse mecanismo e à oxidação da GSH para GSSG (ZHANG et al., 2004). É por isso que a redução dos níveis de GSH indica uma situação de estresse oxidativo severo provocado pela exposição dos peixes ao fungicida, podendo levar à peroxidação lipídica, observada neste estudo, e dano tecidual.

O conteúdo de ácido ascórbico (AsA) também foi encontrado diminuído nos peixes expostos ao tebuconazole no primeiro experimento (CL₅₀-96h). Da mesma forma que os antioxidantes enzimáticos, as defesas não enzimáticas mostraram-se reduzidas após a exposição ao fungicida. O papel do AsA como antioxidante se deve ao fato dele impedir que outros compostos sejam oxidados, além de evitar a peroxidação lipídica por meio de várias reações (BENDICH et al., 1986; PADAYATTY et al., 2003). De acordo com SAYEED et al. (2003), os níveis de AsA diminuíram após a exposição de *C. punctata* ao inseticida deltametrina. Em contra partida, FERREIRA et al. (2010) relataram aumento de AsA em *R. quelen* expostos por 96 horas ao fungicida tebuconazole. Com isso, observa-se que diferentes padrões de respostas podem ser obtidas em relação ao conteúdo de AsA em peixes expostos a pesticidas, embora sejam escassos os relatos da literatura que abordam uma investigação neste aspecto. Considerando que esse antioxidante não enzimático desempenha um papel importante no sentido de atenuar alguns efeitos tóxicos de espécies reativas de oxigênio, pode-se inferir que a redução no conteúdo de AsA, somado à inibição de enzimas antioxidantes e à redução da GSH, agravou a situação de estresse oxidativo em que se encontrava os peixes, devido à exposição ao tebuconazole.

A exposição de peixes a pesticidas, além de provocar alterações em defesas antioxidantes, também afeta o metabolismo de carboidratos e de proteínas, resultando em desordens que alteram a homeostase do animal (CRESTANI et al., 2006; FONSECA, et al., 2008; SANCHO et al., 2010). No primeiro experimento, os peixes que estiveram em contato com tebuconazole durante 96 horas, foram afetados adversamente pelo fungicida. Em relação ao metabolismo de carboidratos, foi observado aumento nos níveis de glicose e glicogênio somente na concentração 1,5 mg/L, enquanto que os níveis de lactato não apresentaram alteração significativa. ORUÇ & ÜNER (1999) verificaram aumento nos níveis de glicose na mesma espécie de peixe deste estudo, após 96 horas de exposição ao herbicida 2,4-Diamin. Semelhante a esses resultados, o fungicida triclazole também provocou uma elevação nos níveis de glicose em *Danio rerio* (SANCHO et al., 2009). O aumento dos níveis de glicose verificado na concentração 1,5 mg/L constitui uma estratégia fisiológica do peixe, a fim de manter os níveis de glicemia requeridos pelo animal em uma condição de estresse. Autores têm reportado aumento nos níveis de glicogênio em *R. quelen* e *L. obtusidens* expostos, respectivamente, aos herbicidas

glifosato e clomazone, em diferentes condições experimentais (GLUSCZAK et al., 2007; MORAES et al., 2009). O aumento nos níveis de glicogênio representa uma resposta adaptativa do peixe ao tóxico, sugerindo que o animal estaria poupando as reservas de carboidrato e oxidando proteína. De fato, na presente investigação, foi observada a ocorrência do catabolismo protéico após exposição ao fungicida nas concentrações 2,0 e 2,5 mg/L. Esses resultados estão de acordo com os obtido por DAVID et al. (2004), após a exposição de *C. carpio* ao inseticida cipermetrina. BEGUM (2004) também relatou diminuição dos níveis protéicos em *Clarias batrachus* expostos ao inseticida carbofuran. A diminuição dos níveis de proteína pode representar uma resposta adaptativa do peixe a uma condição de estresse, utilizando o catabolismo protéico para suprir a demanda energética. A necessidade de manter a glicemia em uma condição estressante, leva à estimulação de processos como lipólise e proteólise para usar os produtos de degradação como fonte de energia disponível (SANCHO et al., 2010). Além disso, a redução de proteína pode ser atribuída à destruição ou falha da função celular com conseqüente prejuízo à síntese protéica. Em relação aos níveis de aminoácidos e amônia, não foram observadas alterações significativas.

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que *C. carpio* é mais sensível ao tebuconazole (Folicur®) que *R. quelen* e *D. rerio*, uma vez que a CL_{50} (96 h) desse fungicida encontrada neste estudo para carpa é 2,37 mg/L, enquanto que a CL_{50} (96 h) do mesmo pesticida para as outras duas espécies de peixe é 5,3 mg/L e 19,6 mg/L, respectivamente.

A investigação dos parâmetros TBARS e proteína carbonil, em fígado de carpas, é recomendada para avaliar a toxicidade do tebuconazole, em programas de monitoramento ambiental, uma vez que a elevação dos níveis de TBARS e de proteína carbonil, tanto em condições de campo quanto de laboratório, demonstrou que o fígado foi o órgão mais afetado.

A atividade da enzima AChE não é um parâmetro recomendado como biomarcador da exposição de carpas ao tebuconazole, pois a atividade dessa enzima não se mostrou alterada após o primeiro experimento (CL_{50} -96 h). No segundo experimento a atividade enzimática foi induzida em cérebro somente na condição de campo, não ocorrendo alteração significativa em condições de laboratório.

O sistema de defesa antioxidante enzimático, representado pelas enzimas SOD, CAT e a enzima de detoxificação GST foi adversamente afetado no primeiro experimento, sugerindo que a super produção de EROs, decorrente da toxicidade do fungicida, pode ter levado à inibição enzimática e, conseqüentemente, à peroxidação lipídica.

A redução dos níveis de antioxidantes não enzimáticos GSH e AsA observada após a exposição ao tebuconazole, possivelmente comprometeu a eficiência do sistema de defesa não enzimático, contribuindo para o agravamento do estresse oxidativo nas carpas expostas ao fungicida.

A exposição de *C. carpio* ao tebuconazole provocou alteração em alguns parâmetros relacionados ao metabolismo de carboidratos e proteínas. O aumento nos níveis de glicose e glicogênio na concentração 1,5 mg/L e a redução nos níveis de proteína nas concentrações 2,0 e 2,5, podem indicar um mecanismo adaptativo

do peixe ao tóxico, utilizando o catabolismo protéico como fonte de energia alternativa.

Após sete dias de exposição ao tebuconazole em condições de campo (lavoura de arroz) e laboratório, conclui-se que o metabolismo de *C. carpio* foi adversamente afetado pelo fungicida. No entanto, em termos comparativos, torna-se difícil especificar qual situação se mostrou mais tóxica e prejudicial para os peixes, uma vez que efeitos deletérios ao organismo, falha no mecanismo de defesa antioxidante e ocorrência de estresse oxidativo foi verificado em ambas as condições experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 15 maio 2010.

ALMEIDA, M.G.; FANINI, F.; DAVINO, S.C.; AZNAR, A.E.; KOCH, O.R.; BARROS, S.B.de M. Pro-and anti-oxidant parameters in rat liver after short-term exposure to hexachlorobenzene. **Human and Experimental Toxicology**, v. 16, p. 257-261, 1997.

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

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

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

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

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

BAYER CROPSCIENCE LIMITED. **Environmental Information Sheet Folicur®** MAPP number 11278. CPA Guidance Notes version 3. ©EIS, 2005.

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

BENDICH, A.; MACHLIN, L.J.; SCANDURRA, O.; BURTON, G.W.; WAYNER, D.D.M. The antioxidant role of vitamin C. **Advances in Free Radicals Biology & Medicine**, v. 2, p. 419-444, 1986.

BERENZEN, N.; LENTZEN-GODDING, A.; PROBST, M.; SCHULZ, H.; LIESS, M. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticides concentrations in small lowland streams on a landscape level. **Chemosphere**, v. 58, p. 683-691, 2005.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. In: Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Legislação federal de agrotóxicos e afins**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, p.7-13, 1998.

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

CASILLAS, E.; MEYERS, M.; AMES, W. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. **Aquatic Toxicology**, v. 3, p. 61-78 , 1983.

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

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

CATTANI, O.; SERRA, R.; ISANI, G.; RAGGI, G.; CORTESI, P.; CARPENE, E. Correlation between metallothionein and energy metabolism in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to cadmium. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 113, p. 193.199, 1996.

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

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

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

CESP. Companhia Energética de São Paulo. **Criação de carpa**. 2 ed. São Paulo, 1985

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

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

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

DAVID, M.; MUSHIGERI, S.B.; SHIVAKUMAR, R.; PHILIP, G.H. Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. **Chemosphere**, v. 56, p. 347-352, 2004.

DE SMET, H.; BLUST, R. Stress responses and changes in protein metabolism in Carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 255-262, 2001.

DOYOTTE, A.; COSSU, C.; JACQUIN, M.C.; BABUT, M.; VASSEUR, P. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquatic Toxicology**, v. 39, p. 93-110, 1997.

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

ELIA, A.C.; GALARINI, R.; TATICCHI, M.I.; DORR, A.J.; MANTILACCI, L. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 55, p. 162-167, 2003.

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

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

GADAGBUI, B.K.M; ADDY, M.; GOKSOYR, A. Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudwsh (*Clarias anguillaris*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 114, p. 201-211, 1996.

GALLI, L.F.; TORLONI, C.E.C. **Criação de peixes**. 3 ed. São Paulo: Nobel, 1989.

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

GUNNINGHAM, N.; SINCLAIR, D. Policy instrument choice and diffuse source pollution. **Journal of Environmental Law**, v. 17, p. 51-81, 2005.

HAI, D.Q.; VARGA, S.I.; MATKOVICS, B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 117, p. 83-88, 1997.

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

KAVITHA, P.; RAO, J.V. Sub-lethal effects of profenofos on tissue-specific antioxidative responses in a euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1727-1733, 2009.

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

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

KONWICK, B.J.; GARRISON, A.W.; AVANTS, J.K.; FISK, A.T. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 372-381, 2006.

KREUTZ, L.C., BARCELLOS, L.J.G., SILVA, T.O., ANZILIERO, D., MARTINS, D., LORENSON, M., MARTENINGHE, A., SILVA, L.B. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1050-1055, 2008.

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

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

MAHTTIESSEN, P.; SHEAHAN, D.; HARRISON, R.; KIRBY, M.; RYCROFT, R.; TURNBULL, A.; VOLKNER, C.; WILLIAMS, R. Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 30, p. 111-119, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001.

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

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

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

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

PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S.K.; LEVINE, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, p. 18-35, 2003.

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

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

PEÑA-LLOPIS, P.S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. **Chemosphere**, v. 47, p. 485-497, 2002.

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

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

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

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

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

SANCHO, E.; FERNÁNDEZ-VEGA, C.; VILLARROEL, M.J.; ANDREU-MOLINER, E.; FERRANDO, M.D. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 150, p. 25-32, 2009.

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

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

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

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

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

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

TONI, C.; MENEZES, C.C.; LORO, V.L.; CLASEN, B.E.; CATTANEO, R.; SANTI, A.; PRETTO, A.; ZANELLA, R.; LEITEMPERGER, J. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal of Applied Toxicology**. Doi 10.1002/jat.1530. Published Online: 30 Apr 2010.

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

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

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

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

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

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

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, p. 167-174, 2004.