

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E
ESTUDO DE LESÕES HISTOPATOLÓGICAS EM
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A
AGROQUÍMICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DAIANE FERREIRA

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E ESTUDO DE
LESÕES HISTOPATOLÓGICAS EM JUNDIÁS (*Rhamdia
quelen*) EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS**

por

Daiane Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da
Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
MESTRE EM FARMACOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

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

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E ESTUDO DE LESÕES
HISTOPATOLÓGICAS EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A
AGROQUÍMICOS**

elaborada por

DAIANE FERREIRA

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos (UPF)
(Orientador – Presidente)

Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto (UFSM)

Profa. Dra. Viviane Woehl (UFSC)

Santa Maria, 26 de novembro de 2010.

*Dedico esta conquista aos meus pais, que, aceitaram sem questionar,
como seus, os meus sonhos. Sempre me incentivando, apoiando e
sustentando-me em suas bases fortes de amor, carinho, proteção e luta.*

*Nunca me deixando desistir.
Esta vitória também é de vocês.
Com amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela eterna bondade, força e oportunidade a mim concedidas para que eu pudesse dar esse importante passo em minha vida.

Aos meus pais, pela vida, amor, carinho e confiança. Por ser sempre meu porto seguro diante das tantas adversidades. Pelas palavras e gestos de incentivo. Vocês são tudo para mim.

Aos meus dois anjos da guarda, Marieta (*in memoriam*) e Tia “Bitá”, pelo fundamental apoio, muitas vezes financeiro, pelo amor, pelas muitas orações e pelo orgulho que sempre tiveram de mim. Sempre me fazendo acreditar que iria valer a pena. A vocês todo amor, admiração e respeito.

As minhas irmãs Sandra, Simone, Silvane e Andriele (sempre tão ouvintes e cheias de palavras incentivadoras), ao meu irmão Rafael, aos amados sobrinhos Lucas (filho, irmão, amigo, companheiro...), Maurício e Murilo (a dupla “M&Ms”), que com um sorriso e carinho renovaram minhas forças, meus queridos cunhados Fagner (jamais esquecerei o email intitulado “pra dar força”) e Ben Hur, que sempre me apoiaram e acreditaram no meu trabalho.

As minhas queridas irmãs do coração Deise e Taís (“porque juntas somos mais!”), pelo carinho, amor, ajuda pessoal, profissional e acadêmica, conversas renovadoras, descontraídas, felizes. Taís obrigada por me emprestar teus pais Delcio e Doris, o amor e carinho deles também foi fundamental nessa fase de minha vida. Deise teu carinho incondicional e tuas palavras centradas, animadoras, me recompuseram inúmeras vezes. Vocês são parte importante do meu sucesso. Amo vocês e as levarei no coração para sempre.

Ao meu namorado “Chico”, pelo carinho, amor, palavras incentivadoras e compreensão nessa etapa profissional de minha vida. Pelos momentos de descontração, pelas tentativas, sempre bem sucedidas, de me tirar da rotina maçante de trabalho. Obrigada por tudo.

Ao meu muito competente orientador Dr. Leonardo Barcellos. Por toda dedicação, compreensão, conselhos, apoio e carinho. Não tenho palavras para agradecer, tanto a ele quanto a sua querida família, que me acolheu como se eu fosse um dos seus. Obrigada de coração.

A minha co-orientadora Dra. Vania Lucia Loro, pela acolhida em seu laboratório, me dando total liberdade de trabalho. Pela amizade, carinho e conselhos. Sua participação na realização desse trabalho foi de fundamental importância.

As queridas amigas e colegas de laboratório Roberta, Bárbara (pelas infindáveis, renovadoras e animadas conversas), Cândida e Charlene (pelo apoio ao meu trabalho científico e grande amizade). E pelas inúmeras tentativas de todas de “tirar-me do casulo”!

Aos estagiários do laboratório 2238 da Bioquímica/UFSM, Doti, Tatá e Rodrigo, sempre prontos a ajudar com muita dedicação e carinho.

Ao professor Dr. Bernardo Baldisserotto, por toda a disponibilidade e ajuda.

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

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E ESTUDO DE LESÕES HISTOPATOLÓGICAS EM JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS

AUTORA: DAIANE FERREIRA
ORIENTADOR: LEONARDO JOSÉ GIL BARCELLOS
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de novembro de 2010

A contaminação do ambiente aquático por agrotóxicos é um problema de importância mundial, devido ao seu efeito tóxico em organismos não-alvo. Estes produtos podem afetar parâmetros toxicológicos em peixes. Entre os efeitos que os agrotóxicos podem causar em peixes está a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e alterações em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, o que pode evidenciar uma situação de estresse oxidativo. Várias respostas bioquímicas e fisiológicas ocorrem quando um pesticida entra no organismo, resultando na adaptação do organismo ao contaminante ou se o organismo não consegue metabolizar com eficiência estes produtos, os mesmos podem induzir toxicidade. Alevinos de *Rhamdia quelen* foram expostos a concentrações subletais de parationato metílico (MP), um herbicida a base de glifosato (GLI) e tebuconazole (TEB). O fígado de *R. quelen* exposto a MP e TEB mostrou um maior nível de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), superior nos peixes no grupo controle (56% e 59%, respectivamente). Em contraste, GLI não alterou a produção de TBARS. Ocorreu aumento da carbonilação protéica apenas nos peixes expostos a TEB. Os peixes expostos aos três agrotóxicos mostraram uma diminuição significativa da atividade da catalase (52%, 48%, e 67%, respectivamente) e aumento da atividade da glutatona-S-transferase (57%, 46% e 160%, respectivamente). Os peixes expostos a MP, GLI e TEB apresentaram um aumento de glutatona reduzida (151%, 472% e 130%, respectivamente, quando comparado com os níveis do grupo controle) e concentrações de ácido ascórbico (121%, 102% e 184%, respectivamente), enquanto que o conteúdo de tióis-não-proteicos aumentou apenas em *R. quelen* expostos a tebuconazole. Os peixes expostos a MP e TEB mostraram diversas alterações histopatológicas no fígado, incluindo a degeneração dos hepatócitos e estagnação biliar. O presente trabalho relata pela primeira vez a toxicidade dos pesticidas MP e do fungicida TEB em *R. quelen*, e sugere que a toxicidade de

GLI é relativamente menor para os peixes. Os dados apresentados demonstram que concentrações sub-letais de MP, TEB podem causar alterações nos parâmetros de estresse oxidativo, bem como lesões de células hepáticas em *R. quelen* e que estes parâmetros têm o potencial de serem desenvolvidos como biomarcadores de exposição a esses agrotóxicos.

Palavras-chaves: herbicida a base de glifosato; dano hepático; parationato metílico; estresse oxidativo; tebuconazole.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

AUTHOR: DAIANE FERREIRA
ADVISOR: LEONARDO JOSÉ GIL BARCELLOS
Date and Place of the defense: November 26th, 2010, Santa Maria

Due to the proximity of crop and fish culture areas, some agrichemicals that could be harmful for fish could enter into fishponds by different ways, such as by leaching through rain. The contamination of the aquatic environment by pesticides is a problem of global importance because of its toxic effects on non-target organisms. These products may affect toxicological endpoints in fish. Among the effects that pesticides can cause fish is the formation of reactive oxygen species (ROS) and changes in antioxidant enzymatic and non-enzyme, which may show a situation of oxidative stress. The formation of ROS may be associated with different pathological processes in fish exposed to pollutants such as pesticides. Several biochemical and physiological responses occur when a pesticide enters the body, resulting in the adaptation of the organism to the contaminant or if the body can not efficiently metabolize these products, they may induce toxicity. *Rhamdia quelen* (Teleostei) were exposed to sub-lethal concentrations of methyl parathion (MP), a glyphosate based herbicide (Gly), and tebuconazole (Teb). The liver of *R. quelen* exposed to MP and Teb showed enhanced levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), compared to the control fish (56% and 59%, respectively). In contrast, Gly did not alter the TBARS generation. The protein carbonyl content increased only in fish exposed to Teb. Fish exposed to the three agrichemicals showed a significant decrease of catalase activity (52%, 48%, and 67%, respectively) and increased glutathione-S-transferase (57%, 46%, and 160%, respectively) activity. Fish exposed to MP, Gly, and Teb showed higher reduced glutathione (151%, 472%, and 130%, respectively, when compared to the control levels) and ascorbic acid concentrations (121%, 102%, and 184%, respectively), while the non-protein thiol content increased only in *R. quelen* exposed to tebuconazole. Fish exposed to MP and Teb showed several pathological changes in the liver, including hepatocyte degeneration and bile stagnation. The present work reports for the first time the toxicity of the pesticide MP and the fungicide Teb in *R. quelen*, and as in other works, suggests the relatively lower liver toxicity

of Gly for fish. The data presented herein demonstrate that sublethal concentrations of MP and Teb cause changes in oxidative stress parameters as well as hepatic cell injuries in *R. quelen*, and that these parameters have the potential to be developed as bioindicators of exposure to these agrichemicals.

Keywords: Glyphosate based herbicide; hepatic damage; Methyl-parathion; oxidative stress; silver catfish; tebuconazol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

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

Figura 2 - Estrutura do composto Tebuconazole ((*RS*)-1-*p*-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol). Adaptado de www.agrocare.com.cn.

Figura 3 - Estrutura do composto parationato metílico (tiofosfato de dimetil – paranitrofenila). Adaptado de www.agripec.com.br.

Figura 4 - Exemplar de jundiá, *Rhamdia quelen*.

Figura 5 - Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio na presença ou não de xenobióticos.

ARTIGO

Figure 1- Hepatic activity of (A) Catalase and (B) glutathione-S-transferase (GST) in liver of *Rhamdia quelen* exposed to sublethal concentrations of methyl-parathion (MP), glyphosate (Gly) and tebuconazole (Teb) for 96 h. Data represent the mean \pm S.E.M, (n=10). * Indicates difference between groups and control values (ANOVA followed by Dunnet's test, *P<0.05 ** P<0.01).

Figure 2- Photomicrograph of the hepatic tissue of *Rhamdia quelen* exposed to methyl-parathion, tebuconazole or glyphosate (H&E). (A) Normal hepatic tissue from control fish, showing hepatocytes (circle), sinusoid (arrow) and bile canaliculum (large arrow), 400X. (B) Hepatocyte degeneration (square) and necrosis (arrows) in fish exposed to tebuconazole, 400X. (C) Bile stagnation (arrow) and hepatocyte degeneration (square) in fish exposed to tebuconazole, 400X. (D) Diffused hepatic degeneration in fish exposed to methyl parathion,

100X. (E) Hemorrhage (arrow), congestion (arrow head) and bile stagnation (circle) in fish exposed to methyl parathion, 100X. (F) Normal hepatic tissue from glyphosate exposed fish, 400X.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Componentes do sistema de proteção antioxidante. Adaptado de Junior et. al., 1998.

ARTIGO

Tabela 1 - Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl protein, reduced glutathione (GSH), non-protein thiols, ascorbic acid, alanine aminotransferase (ALT) aspartate aminotransferase (AST) in liver of *Rhamdia quelen* exposed to sublethal concentrations of methyl-parathion (MP), glyphosate (Gly) and tebuconazole (Teb) for 96h.

Tabela 2- Histological alterations found in the liver of *R. quelen* following acute exposure (96 h) to methyl-parathion (MP), glyphosate based herbicide (Gly) and tebuconazole (Teb) or only to water (C), their respective stages of damage to the tissue and frequency of occurrence.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ALT:** Alanina transaminase
- AMPA:** Ácido aminometilfosfônico
- AST:** Aspartato transaminase
- CAT:** Catalase
- CUPS:** Uso corrente de pesticidas
- CYP:** Citocromo
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- EPA:** Agência americana de proteção ambiental
- EPSPS:** 5-enol-piruvilshiquinato-3 fosfato sintase
- EROs:** Espécies reativas de oxigênio
- GLI:** Glifosato
- GPx:** Glutathione peroxidase
- GSH:** Glutathione reduzida
- GST:** Glutathione S-transferase
- HHA:** Hipotálamo hipófise adrenal
- H₂O₂:** Peróxido de hidrogênio
- IPA:** Sal de Isopropilamina
- LPO:** Lipoperoxidação lipídica
- MP:** Metil Paration
- OH:** Radical hidroxila
- O₂:** Ânion superóxido
- R. quelen:** *Rhamdia quelen*
- SNVS:** Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária
- SOD:** Superóxido dismutase
- TBARS:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico
- TEB:** Tebuconazole

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 07 |
| ABSTRACT | 09 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 11 |
| LISTA DE TABELAS | 13 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 14 |
| APRESENTAÇÃO | 16 |
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 3.1 Agroquímicos..... | 20 |
| 3.1.1 Herbicida Glifosato..... | 20 |
| 3.1.2 Fungicida Tebuconazole..... | 21 |
| 3.1.3 Inseticida Metil Paration..... | 22 |
| 3.2 Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)..... | 23 |
| 3.3 Estresse oxidativo..... | 24 |
| 3.3.1 Marcadores de defesa antioxidante e de danos oxidativos..... | 26 |
| 3.3.2 Histopatologia..... | 29 |
| 3.3.3 Aspartato Transaminase (AST)..... | 29 |
| 3.3.4 Alanina transaminase (ALT)..... | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 4.1 Artigo: Assesment of oxidative stress in Rhamdia quelen exposed to agrichemicals. Daiane Ferreira, Adriana Costa da Mota, Luiz Carlos Kreutz, Cândida Toni, Vania Lucia Loro, Leonardo José Gil Barcellos..... | 32 |
| 5 DISCUSSÃO | 41 |
| 6 CONCLUSÕES | 44 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |

APRESENTAÇÃO

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

A seguir, os **RESULTADOS** são apresentados na forma de **MANUSCRITO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito 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 o manuscrito contido neste estudo.

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

1. INTRODUÇÃO

As atividades de origem agrícola oferecem riscos à qualidade das águas subterrâneas e superficiais, especialmente pelo uso de agrotóxicos que, juntamente com muitos de seus metabólicos, podem causar danos à saúde humana e ao meio ambiente (GOMES & SPADOTTO, 2002). Os herbicidas e fungicidas são usados para controle de pragas no ambiente aquático e agrícola, gerando graves preocupações sobre os potenciais efeitos indesejáveis destes produtos químicos sobre o meio ambiente.

O Glifosato [sal de isopropilamina (IPA) do ácido N-fosfonometilglicina] é registrado no Brasil para o controle não seletivo de mono e dicotiledôneas em pós-emergência em diversas culturas (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). O organofosforado Metil Paration (MP) (tiofosfato de dimetil - paranitrofenila) é classificado toxicologicamente de acordo com a Portaria da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) N^o 10 de 1985 como muito tóxico (Relatório Técnico AGRIPPEC, 1987). A intoxicação aguda por este organofosforado deve-se à inibição da enzima acetilcolinesterase, com acúmulo de acetilcolina, que age em nível de sistema nervoso central, podendo levar à morte por falência respiratória (HERNANDEZ *et al.*, 1998).

O fungicida tebuconazole (Folicur), do grupo dos azóis, é comumente utilizado em culturas de plantas ou como preservativo de madeira (AL SZAREK *et al.*, 2000). Este composto é classificado como tóxico para organismos aquáticos (BAYER CROP SCIENCE LIMITED, 2005). Juntamente com glifosato e metil paration é um potencial desregulador endócrino porque causa a inibição de várias enzimas esteroidogênicas chave (KJAERSTAD *et al.*, 2008).

O jundiá *Rhamdia quelen* da família Heptapteridae, é uma espécie endêmica do sul da América do Sul, capaz de crescer e reproduzir-se em qualquer região de clima temperado ou subtropical (CERICATO *et al.*, 2008).

O equilíbrio entre defesas antioxidantes e a geração de EROs é fundamental para a homeostase em uma perturbação no equilíbrio pró-oxidante antioxidante em favor do primeiro, levando a uma potencial lesão. Os indicadores do estresse oxidativo incluem bases de DNA (ácido desoxirribonucléico) alteradas, produtos de oxidação de proteínas e produtos de peroxidação de lipídeos (AHMAD *et al.*, 2000; MARAN *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010).

Espécies reativas de oxigênio são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular (O_2) ou derivados dos produtos da redução. As principais espécies reativas de oxigênio são o anion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^\cdot). Estes compostos podem reagir com macromoléculas biológicas e produzir a peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e oxidação de proteínas, resultando no estresse oxidativo (MONTEIRO *et al.*, 2006). Os sistemas de defesa antioxidante naturais podem ser enzimático, que inclui a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx) e não enzimático, representado pelos níveis de ácido ascórbico, tióis não protéicos e glutathione reduzida (GSH) (AHMAD *et al.*, 2000; ORUÇ *et al.*, 2004). O sistema de defesa antioxidante não-enzimático atua impedindo reações de auto-oxidação e tem sido vinculado com a redução de radicais livres (SAYEED *et al.*, 2003). Dentre estes, destaca-se a GSH, o mais abundante tiol não-protéico e um dos principais agentes redutores encontrados nas células e atua como co-fator para a GST e GPx (MONTEIRO *et al.*, 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010).

Os efeitos dos herbicidas sobre os peixes variam de acordo com a espécie, estágio de crescimento, com o produto (formulação utilizada), concentração do produto, tempo de exposição (CRESTANI *et al.*, 2007; GLUSCZAK *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008; MIRON *et al.*, 2008; CATTANEO *et al.*, 2008). A análise histopatológica é proposta como uma ferramenta eficiente e sensível para o controle de poluição nos corpos d' água (COSTA *et al.*, 2009). Os hepatócitos podem ser considerados o primeiro alvo da toxicidade de uma substância, o que caracteriza o fígado como um órgão biomarcador da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1998).

O uso de biomarcadores de peixes no estudo da resposta biológica e bioquímica a contaminantes tem atraído grande interesse já que podem ser encontrados praticamente em todos os ambientes aquáticos e desempenham importante papel na cadeia alimentar, pois têm a função de transportar energia de níveis tróficos inferiores para níveis superiores (BEYER *et al.*, 1996).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi verificar se a exposição a formulações comerciais do herbicida glifosato, fungicida tebuconazole e pesticida metilparation altera parâmetros de estresse oxidativo e lesões histológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o perfil oxidativo através da medida dos níveis de peroxidação lipídica pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a carbonilação de proteínas no tecido hepático de jundiás expostos ao glifosato, ao tebuconazole e ao parationato metílico;
- ✓ Avaliar a resposta antioxidante enzimática através da determinação da atividade da enzima catalase (CAT) em fígado de jundiás expostos ao glifosato, ao tebuconazole e ao parationato metílico;
- ✓ Determinar a atividade da glutiona S-transferase (GST) em fígado de jundiás expostos ao glifosato, ao tebuconazole e ao parationato metílico;
- ✓ Determinar o conteúdo dos antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico, glutiona reduzida (GSH) e tióis não-protéico em fígado de jundiás expostos ao glifosato, ao tebuconazole e ao parationato metílico;
- ✓ Avaliar as lesões histopatológicas no fígado de jundiás expostos ao glifosato, ao tebuconazole e ao parationato metílico;
- ✓ Determinar as enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) em jundiás expostos ao glifosato, ao tebuconazole e ao parationato metílico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Agroquímicos

Segundo Wilson e Tisdell (2001), o consumo mundial de pesticidas tem chegado a 2,6 milhões de toneladas e deste total, 85% são utilizados na agricultura. Considerando a América Latina, o Brasil desponta como o maior consumidor de agrotóxicos, com um consumo estimado em 50% da quantidade comercializada nesta região. Estes englobam compostos quimicamente bastante diferenciados, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: os organofosforados, os piretróides, os organoclorados e os carbamatos (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001).

A poluição dos ecossistemas aquáticos pode provocar a perda da biodiversidade. A poluição a nível de população tem degradado ecossistemas fundamentais por meio de alterações moleculares nos peixes, refletindo na diminuição da qualidade e da sustentabilidade destes ecossistemas. A contaminação dos recursos aquáticos no nível de organismo é alvo de preocupações humanas, tendo em vista que o consumo direto e indireto de peixes e água contaminada pode causar sérios danos ao organismo (RAMSDORF, 2007).

3.1.1 Herbicida Glifosato

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina, $C_3H_8NO_5P$), (Figura 1) é um herbicida sistêmico não seletivo, aminoácido branco, sem odor, cristalino, tem formulação molecular $C_3H_8NO_5P$, peso molecular 169,1g/mol e é ingrediente ativo do Roundup[®] (MALIK *et al.*, 1989). Pertence ao grupo químico das glicinas. Possui solubilidade em água de 157 $\mu\text{g/L}$ a 25°C e meia vida no solo de 30 a 90 dias, dependendo do tipo de solo e do nível de matéria orgânica, sendo metabolizado a ácido aminometilfosfônico (AMPA) e CO_2 (GIESY *et al.*, 2000; JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2002).

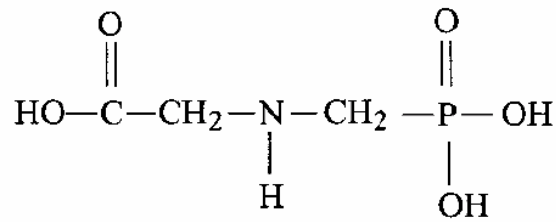


Figura 1 - Estrutura do composto glifosato (ácido N-fosfonometilglicina) (adaptado de RODRIGUES & ALMEIDA, 2005).

A toxicidade aguda é considerada baixa, pertencendo à classe toxicológica IV (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Os peixes e os invertebrados aquáticos são os mais sensíveis a este herbicida e aos outros componentes de seus produtos comerciais. Recentes estudos têm mostrado efeitos adversos potenciais do Roundup[®] e seus componentes sobre os peixes, podendo afetar o metabolismo energético, formação de radicais livres e atividade da acetilcolinesterase (GLUSCZAK *et al.*, 2006; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; LUSHCHAK *et al.*, 2009).

3.1.2 Fungicida Tebuconazole

O tebuconazole (nome comercial Folicur[®]) (*RS*)-1-*p*-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol (Figura 2), tem formulação molecular C₁₆H₂₂ClN₃O é um fungicida do grupo químico triazol com meia vida no solo de 20-25 dias, utilizado para o controle de pragas. É classificado como tóxico para organismos aquáticos que podem causar efeitos negativos no ambiente aquático (BAYER CROPSCIENCE LIMITED, 2005).

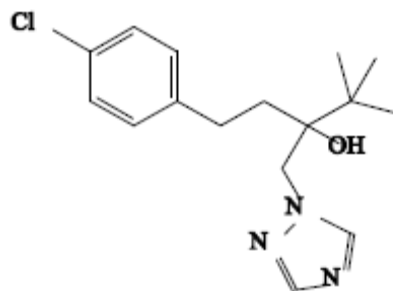


Figura 2- Estrutura do composto Tebuconazole ((*RS*)-1-*p*-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol). Adaptado de www.agrocare.com.cn.

Segundo KONWICK (2006), fungicidas de uso corrente (CUPS), como por exemplo, tebuconazole, podem ser definidos como aqueles pesticidas que estão atualmente registrados para o uso, geralmente desenvolvidos a partir de síntese química, e normalmente são

utilizados no setor agrícola. Há preocupação com a ampla aplicação da CUPS e seus possíveis efeitos prejudiciais sobre a saúde dos ecossistemas aquáticos que podem surgir a partir de pulverizados ou escoamento superficial, após eventos de chuva.

Um efeito de grande importância em relação aos produtos químicos, entre eles o tebuconazole, é quando estes imitam a função endócrina dos tecidos, causando preocupação devido aos seus efeitos deletérios no sistema endócrino de várias espécies. Nos mamíferos, um padrão similar de toxicidade para tebuconazole como efeitos pró-feminização foi descrita (SANCHO, 2010).

3.1.3 Inseticida Metil Paration

O organofosforado metil paration (Folidol 600 fabricado por Bayer), tiofosfato de dimetil – paranitrofenila (figura 3), de fórmula molecular $C_8H_{10}NO_5PS$ com concentração do ingrediente ativo de 600g/L, é inflamável e não corrosivo. Utilizado no controle de pragas e insetos em diversos cultivos, com meia vida altamente disperssível. Normalmente aplicado por pulverização na concentração usual de soluções 0,05-0,1%.

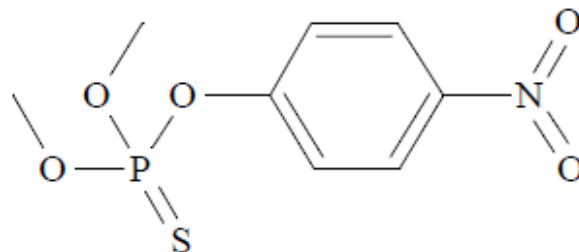


Figura 3: Estrutura do composto metil paration (tiofosfato de dimetil – paranitrofenila). Adaptado de www.agripec.com.br.

Dentro da classificação toxicológica de acordo com a Portaria da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) N^o 10 de 1985 está enquadrado como muito tóxico (Relatório Técnico AGRÍPEC, 1987). Tem moderada solubilidade em água e é altamente tóxico para peixes (FERREIRA *et. al.*, 2010). A intoxicação por este organofosforado ocorre devido à inibição da enzima acetilcolinesterase, fazendo com que ocorra um grande acúmulo de acetilcolina, que age em nível de sistema nervoso central (pois acaba agindo como um pseudo-substrato ao imitar a forma da acetilcolina), podendo levar à morte por falência respiratória (HERNANDEZ *et al.*, 1998).

Em sistemas de cultivo e produção de peixes, o metil paration é utilizados diretamente nos viveiros com a função de eliminar ou controlar a ocorrência de larvas e insetos. Deixando assim os peixes e demais animais aquáticos totalmente expostos a seus efeitos negativos, seja pelo manejo habitual do produto ou por contaminação acidental.

3.2 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O Jundiá, *Rhamdia quelen* (figura 4) da família Heptapteridae, ordem Siluriformes, gênero *Rhamdia* e classe Osteichthyes, é uma espécie promissora para cultivo de peixes sendo encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México, no Brasil está presente na região da Depressão Central do Rio Grande do Sul (GUEDES, 1980). Devido a sua prolificidade, robustez e bom ganho em peso, a espécie tem sido intensivamente estudada, tanto em pesquisa aplicada – como alternativa de produção de peixes (BARCELLOS *et al.*, 2004b; SILVA *et al.*, 2006) – quanto em pesquisa básica avaliando perfis hormonais reprodutivos (BARCELLOS *et al.*, 2001b; 2002), resposta ao estresse (BARCELLOS *et al.*, 2001^a; 2003 e 2006b), efeito de defensivos agrícolas sobre sua fisiologia (SOSO *et al.*, 2007).

É uma espécie capaz de suportar o forte frio do inverno dos países do sul da América do Sul e crescer rapidamente no verão. Quando cultivado a uma densidade de 2 a 4 peixes/m² pode alcançar 600-800g de peso corporal em oito meses. Devido a sua prolificidade, robustez e bom ganho de peso, a espécie tem sido intensivamente pesquisada por vários grupos de pesquisa, tanto em pesquisa aplicada (alternativa de produção de peixes), quanto em pesquisa básica (BARCELLOS *et al.*, 2003).



Figura 4: Exemplar de jundiá, *Rhamdia quelen*.

Aspectos relacionados à fisiologia reprodutiva da espécie já foram bem caracterizados (BARCELLOS *et al.*, 2001b, BARCELLOS *et al.*, 2002). É uma espécie euritérmica. Esse peixe é omnívoro, com tendência piscívora. A maturidade sexual é atingida no primeiro ano de vida. Na natureza, os cardumes desovam em locais com água limpa, calma e de fundo pedregoso. Não apresenta cuidado parental (GOMES *et al.*, 2000).

Sua coloração varia de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia. Ele pode variar a coloração do corpo de acordo com o ambiente que se encontra, pois quando colocados em ambientes claros, o jundiá tende a ficar mais claro e o inverso ocorre quando este peixe se encontra em ambiente escuro. Um melhoramento genético deste peixe produziu o chamado jundiá-cinza, o qual, segundo alguns criadores, teriam melhor rendimento para a piscicultura (GOMES *et al.*, 2000; BALDISSEROTTO & RADÜNZ, 2004).

Vivem em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento. Em experimentos com larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro, observou-se uma acentuada aversão à luz e busca de locais escuros. O crescimento de *R. quelen* aumenta com o incremento da temperatura. Esse crescimento é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida. A taxa de crescimento dos machos é maior do que a das fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, quando a situação se inverte, pois estas passam a crescer mais rapidamente. (GOMES *et al.*, 2000).

O jundiá é uma espécie nativa adaptada a diferentes ambientes, pois apresenta bons resultados em relação à criação principalmente nas regiões mais frias. Uma espécie rústica, de crescimento rápido nos períodos quentes e suporta bem as baixas temperaturas que são características na região Sul do Brasil. O jundiá é um peixe que apresenta grande aceitação no mercado consumidor, tanto para a pesca quanto para a alimentação, tem excelentes características para o processamento industrial (BARCELLOS *et al.*, 2001; 2003).

3.3 Estresse Oxidativo

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo de organismos vivos, assim os radicais livres são produzidos

naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (BARREIROS *et al.*, 2006).

Ao mesmo tempo, seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas a nível intra e extracelular, devido ao desbalanço existente entre suas vantagens e desvantagens. Essas substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, e são comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007). Podem reagir com macromoléculas biológicas e produzir a peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e oxidação de proteínas (Figura 5), resultando no estresse oxidativo (BARATA *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo é um processo fisiopatológico relacionado ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua detoxificação pelos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Além disso, esse processo é considerado um importante mecanismo toxicológico para muito xenobióticos lipofílicos. A exposição e os efeitos de agroquímicos em organismo vivos podem ser estudados através dos biomarcadores. Atualmente, os organismos aquáticos estão continuamente sendo expostos a diversos contaminantes químicos e por isso efeitos adversos podem surgir como resposta aos diferentes mecanismos de toxicidade destes produtos (BARATA *et al.*, 2005).

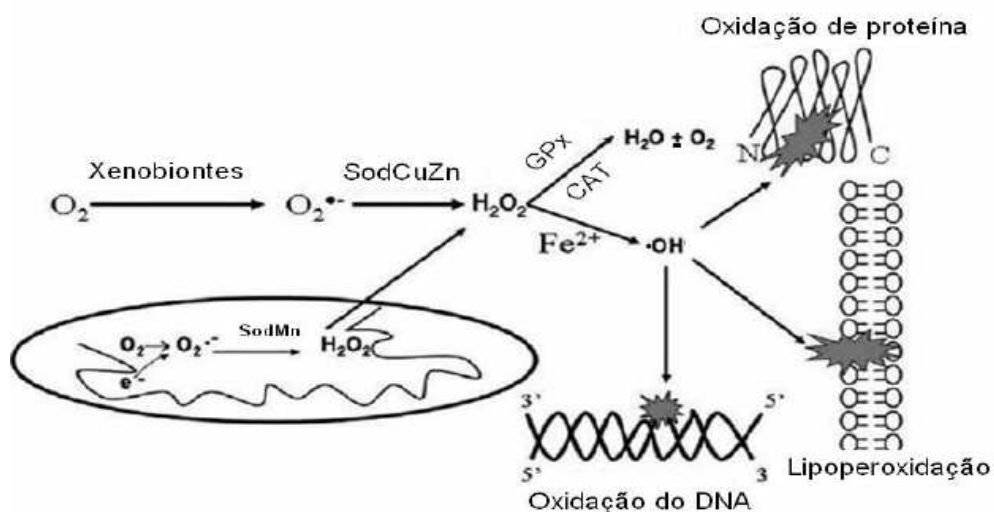


Figura 5. Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio na presença ou não de xenobióticos. Adaptado de Nordberger & Arnér, 2001.

Uma variedade de poluentes ambientais, dentre eles os pesticidas, podem provocar um aumento na produção de EROs em diversos organismos aquáticos, como os peixes, e se os sistemas de defesas antioxidantes forem ineficiente para combater as EROs ocorre uma situação de estresse oxidativo (AHMAD *et al.*, 2000; ÜNER *et al.*, 2005).

Um bom conceito para estresse oxidativo seria como citado em AHMAD *et al.* (2000), MARAN *et al.* (2009) e MODESTO & MARTINEZ (2010), que dizem: “o estresse oxidativo ocorre em situações em que há um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes levando a uma produção excessiva de EROs”. Pode também ser definido como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, onde a quantidade gerada do primeiro é maior, ocorrendo assim possíveis danos oxidativos (ÜNER *et al.*, 2006; ALMROTH *et al.*, 2008). Diversos estudos já evidenciaram estresse oxidativo em peixes expostos a diferentes agrotóxicos (SAYEED *et al.*, 2003; BAGNYUKOVA *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; PEIXOTO *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 2007).

Como já descrito por Stadtman & Levine (2000), a produção de estruturas químicas no metabolismo do oxigênio ameaça a integridade de várias biomoléculas como proteínas e lipídios (AMES *et al.*, 1993; YLA-HERTTUALA, 1999), e ácido desoxirribonucléico (DNA) (AMES *et al.*, 1993; MARNETT, 2000). Além disso, propõe-se que o estresse oxidativo esteja envolvido no processo de envelhecimento, tanto por induzir danos do DNA mitocondrial (DNAm) (AMES *et al.*, 1993; CADENAS & DAVIES, 2000; FINKEL & HOLBROOK, 2000), quanto por outros mecanismos como influência na atividade antioxidante celular natural (KASAPOGLU & OZBEN, 2001; ÍNAL *et al.*, 2001).

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos para proteger seus constituintes e manter seu estado redox. Sob condições fisiológicas normais, os efeitos nocivos das ERO são efetivamente neutralizados pelo sistema celular de defesa antioxidante, que geralmente consiste de enzimas e de pequenas moléculas antioxidantes (DANDAPAT, 2000).

3.3.1 Marcadores de defesa antioxidante e de danos oxidativos

Uma substância antioxidante, por definição, é aquela capaz de inibir a oxidação ou, então, qualquer substância que, mesmo presente em baixa concentração, comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Podem teoricamente

prolongar a fase de iniciação ou inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação (JORDÃO JUNIOR *et al.*, 1998).

Um dos mecanismos das substâncias antioxidantes é agir contra os danos provocados pelos efeitos do processo fisiológico de oxidação no tecido animal. Alguns exemplos de antioxidantes são nutrientes-vitaminas e minerais, e enzimas-proteínas endógenas que ajudam nas reações químicas. Atuam também na prevenção de doenças crônicas como câncer e doenças cardíacas. Na tabela I são exemplificados alguns compostos antioxidantes.

Os sistemas biológicos oferecem condições favoráveis para ocorrência de reações de caráter oxidativo, devido à existência de lipídios insaturados nas membranas celulares, e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem durante o metabolismo normal. A susceptibilidade de uma célula ou de um tecido ao estresse oxidativo depende de um grande número de fatores que incluem a disponibilidade de antioxidantes e a capacidade de inativação ou eliminação dos produtos oxidativos formados (JORDÃO JÚNIOR *et al.*, 1998).

Tabela 1 – Componentes do Sistema Antioxidante (Adaptada de Jordão Junior et al., 1998).

| Antioxidantes não enzimáticos | Proteínas ligadoras de metais | Antioxidantes Enzimáticos |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| Glutaciona | Ceruloplasmina (cobre) | Superóxido dismutase (SOD) |
| Ubiquinona (Coenzima Q) | Metalotioneína (cobre) | Catalase |
| Ácido Úrico | Albumina (cobre) | Glutaciona Peroxidase (GPx) |
| Bilirrubina | Transferrina (ferro) | GST |
| NADPH e NADH | Mioglobina (ferro) | |
| Flavonóides | | |
| Vitamina C | | |
| Vitamina E | | |
| Betacaroteno | | |
| Licopeno | | |
| GSH | | |
| Tióis não proteicos | | |

Em negrito os antioxidantes descritos no texto.

Dentro dos componentes do sistema antioxidante, destacam-se neste trabalho a Catalase (CAT) que é uma hemoproteína que catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 e, por isso, é considerada um dos maiores componentes da defesa antioxidante primária (GAETANI *et al.*, 1989). A CAT está localizada principalmente nos peroxissomos da maioria das células aeróbicas e, em animais, se encontram principalmente no fígado, rins e eritrócitos. Órgãos como cérebro, coração e músculo esquelético contém pequenas quantidades da enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A glutaciona-S-transferase (GST) faz parte de uma família de isoenzimas que desempenha um papel importante na resposta ao estresse oxidante.

É considerada uma enzima de desintoxicação por metabolizar uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, como os xenobióticos, por meio da conjugação destes com a glutatona reduzida (GSH), formando conjugados solúveis em água, reduzindo sua toxicidade e facilitando sua excreção (WILCE & PARKER, 1994; VAN der OOST *et al.*, 2003). A GST é importante na defesa celular mesmo não atuando diretamente contra os radicais livres, pois está associada à biotransformação de xenobióticos como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos. A GST também promove a conjugação da GSH a produtos endógenos causadores de danos oxidantes como radicais hidroxil citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação (DUDLER *et al.*, 1991; BARLING *et al.*, 1993).

A Glutaciona Reduzida (GSH) é um elemento fundamental no sistema de defesa antioxidante, que atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER & ANDERSON, 1983). O grupo sulfidril interage com um radical livre para formar um radical glutaciona, que dimeriza (se emparelha com outro radical glutaciona) para formar a glutaciona oxidada (GSSG). A glutaciona oxidada é então reciclada (reduzida) outra vez em glutaciona reduzida (GSH) para reutilização por meio da enzima glutaciona redutase (GR). A GR (E.C. 1.6.4.2) depende de NADPH como fonte de elétrons, estando, dessa forma, relacionada com a integridade da via das pentoses (ou ciclo das pentoses – PC) (KRETZSCHMAR, 1996). A vitamina C (ácido ascórbico) é hidrossolúvel e também age contra as ERO como o O_2^- e o OH^- . Participa ainda da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000) e, juntamente com a GSH, atua protegendo as células dos danos oxidantes (NORDBERG & ARNER, 2001) – como antioxidantes não enzimáticos.

Os peixes estão freqüentemente expostos ao impacto das ERO porque, diferentemente dos vertebrados terrestres, os animais aquáticos são expostos diariamente a mudanças sazonais de temperatura e oxigênio ou a mudanças nas condições ambientais no seu habitat natural, tais como poluição, disponibilidade de oxigênio, pH, incidência da radiação solar, entre outros (CHOW, 1991; WINSTON & DI GIULIO, 1991; HENRIQUE *et al.*, 1998). Esta situação é facilmente exemplificada pelos peixes de água doce, que vivem em ambientes instáveis como as águas tropicais (KRAMER, 1987; GRAHAM, 1990). Como os outros vertebrados, os peixes possuem sistemas de defesas antioxidantes que utilizam mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos para combater os impactos das ERO (FRAGA *et al.*, 1996).

Os peróxidos produzidos podem ser quantificados indiretamente por um ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), que é acreditado para refletir a intensidade da peroxidação lipídica por meio da quantificação de um dos seus principais produtos finais - dialdeído malônico (LUSHCHAK *et al.* 2009).

3.3.2 Histopatologia

O fígado dos teleósteos é um órgão multifuncional responsável pela conversão do alimento, produção da vitelogenina durante o crescimento gonadal e desintoxicação de compostos estranhos (STEGEMAN & LECH, 1991). Alterações como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusóides e podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, desta forma, considerados como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (THOMAS, 1990; KÖHLER *et al.*, 1992; TEH *et al.* 1997).

POLEKSIC & KARAN (1999) expõem a importância de estudos histopatológicos, em conjunto a outros estudos, na medida de efeitos não letais de pesticidas em peixes. Já em outro estudo, onde foi realizada a análise histológica em jundiás (*R. quelen*) foi observada a vacuolização nos hepatócitos desses peixes, após 192 horas de exposição ao herbicida clomazone na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, e no período de recuperação de 192 horas, a vacuolização foi observada nas concentrações de $0,5$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de clomazone (CRESTANI *et al.*, 2007).

3.3.3 Aspartato Aminotransferase (AST)

Também pode ser chamada de transaminase glutâmico oxaloacética (TGO), é uma enzima que catalisa a reação: aspartato + alfa-queroglutarato = oxaloacetato + glutamato, sendo encontrada em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias do fígado, músculos esquelético e cardíaco, rins, pâncreas e eritrócitos. Quando qualquer um desses tecidos é danificado, a AST é liberada no sangue. Como não há um método laboratorial para saber qual a origem da AST encontrada no sangue, o diagnóstico da causa do seu aumento deve levar em

consideração a possibilidade de lesão em qualquer um dos órgãos onde é encontrada severas (<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>; FLETCHER *et al.*, 1991; SORBI *et al.*, 1999).

3.3.4 Alanina aminotransferase (ALT)

Também pode ser chamada de transaminase glutâmico pirúvica (TGP), é uma enzima que catalisa a reação: aspartato + alfa-queroglutarato = piruvato + glutamato. Estas enzimas são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade. Encontrada em altas concentrações apenas no citoplasma do fígado, o que torna o seu aumento mais específico de lesão hepática; no entanto, pode estar aumentada em conjunto com a AST em miopatias (doenças musculares) severas (<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>; FLETCHER *et al.*, 1991; SORBI *et al.*, 1999).

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados na forma de artigo científico. Da mesma forma, os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no mesmo artigo. O artigo está inserido na presente dissertação na exata forma em que foi publicado.

4.1 Artigo

Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals.

Ferreira, D; Motta, A.C; Kreutz, L.C; Toni, C; Loro, V.L; Barcellos, L.G.G.

Publicado na revista Chemosphere v.79, p. 914-921. 2010.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

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

Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals

Daiane Ferreira^a, Adriana Costa da Motta^b, Luiz Carlos Kreutz^b, Cândida Toni^c, Vânia Lucia Loro^a, Leonardo José Gil Barcellos^{b,*}

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

^b Universidade de Passo Fundo, Curso de Medicina Veterinária, Campus Universitário do Bairro São José, Caixa Postal 611, CEP 99001-970, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2009

Received in revised form 2 March 2010

Accepted 14 March 2010

Available online 3 April 2010

Keywords:

Glyphosate based herbicide

Hepatic damage

Methyl-parathion

Oxidative stress

Silver catfish

Tebuconazole

ABSTRACT

Due to the proximity of crop and fish culture areas, some agrichemicals that could be harmful for fish could enter into fishponds by different ways, such as by leaching through rain. *Rhamdia quelen* (Teleostei) were exposed to sublethal concentrations of methyl parathion (MP), a glyphosate based herbicide (Gly), and tebuconazole (Teb). The liver of *R. quelen* exposed to MP and Teb showed enhanced levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), higher than in the control fish (56% and 59%, respectively). In contrast, Gly did not alter the TBARS generation. The protein carbonyl content increased only in fish exposed to Teb. Fish exposed to the three agrichemicals showed a significant decrease of catalase activity (52%, 48%, and 67%, respectively) and increased glutathione-S-transferase (57%, 46%, and 160%, respectively) activity. Fish exposed to MP, Gly, and Teb showed higher reduced glutathione (151%, 472%, and 130%, respectively, when compared with the control levels) and ascorbic acid concentrations (121%, 102%, and 184%, respectively), while the non-protein thiol content increased only in *R. quelen* exposed to tebuconazole. Fish exposed to MP and Teb showed several pathological changes in the liver, including hepatocyte degeneration and bile stagnation. The present work reports for the first time the toxicity of the pesticide MP and the fungicide Teb in *R. quelen*, and as in other works, suggests the relatively lower liver toxicity of Gly for fish. The data presented herein demonstrate that sublethal concentrations of MP and Teb cause changes in oxidative stress parameters as well as hepatic cell injuries in *R. quelen*, and that these parameters have the potential to be developed as bioindicators of exposure to these agrichemicals.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In southern South America, as in other regions of the world, the common production system is based on integrated plant and animal cultivation, such as crop and fish production. This diversified agricultural system sometimes implies extreme proximity of crop areas and ponds for fish culture and the agrichemicals could enter into fishponds by different ways since the water might run through the cultivated areas; as consequence, the pond environment could be continuously loaded with foreign chemicals (Van der Oost et al., 2003), some of these harmful for fish.

As reviewed by Cericato et al. (2008), in southern Brazil herbicides based on the active substance glyphosate are widely used. The fungicide tebuconazole (Teb) is used in plant cultures or as a wood preservative, and the pesticide methyl parathion (MP) is used in fish culture ponds to kill the aquatic larvae of predatory insects.

The glyphosate formulations are rapidly dissipated from the surface waters, and undergo biodegradation by soil microflora to form α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and CO₂ (reviewed by Glusczak et al., (2007)). The agrichemicals in the azole group, including Teb, are potential endocrine disruptors because they cause the inhibition of several key steroidogenic enzymes (Kjaerstad et al., 2008). Fish could accumulate Teb; the time it takes to reach the maximum concentration varies from 6 to 8 d for *Danio rerio* and *Oncorhynchus mykiss*, respectively (Konwick et al., 2006; Sanchez et al., 2008). MP is a "less persistent" organophosphate insecticide that is moderately soluble in water and acutely toxic to fishes (Walton et al., 1997).

In our previous works (Cericato et al., 2008, 2009; Kreutz et al., 2008), we established the lethal concentrations of these active substances and demonstrated that sublethal contamination with these agrichemicals impairs the capacity of fishes to elevate cortisol levels in response to an additional acute stressor or an injection of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). In addition, other toxic effects of these compounds were verified in some teleost fish, including *R. quelen* (Hussar et al., 2004; Almeida et al., 2005; Glusczak et al., 2006, 2007; Monteiro et al., 2006; Langiano and Martinez, 2008; Lushchak et al., 2009).

* Correspondence to: Leonardo José Gil Barcellos, Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Campus I, Cx Postal 611, Bairro São José, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, Brazil. Tel.: +55 54 316 8100; fax: +55 54 316 8487.

E-mail address: lbarcellos@upf.br (L.J.G. Barcellos).

[†] CNPq fellowship (305905/2006-6).

Exposure to environmental pollutants can result in a greater amount of pro-oxidants than anti-oxidants, in turn resulting in increased reactive oxygen species (ROS) generation (Ahmad et al., 2000) and/or altering antioxidant defenses (Monserrat et al., 2007). The disruption of the pro-oxidant–antioxidant balance in favor of the pro-oxidants is called oxidative stress. Such situation could induce higher lipid peroxidation ratios in tissues and cell damage (Southorn and Powis, 1988), and have been proposed as indicators of pollutant-mediated oxidative stress (Ahmad et al., 2000).

The antioxidant system comprises a group of enzymes and low molecular weight anti-oxidants such as ascorbic acid, reduced glutathione (GSH), and other non-protein thiols (Winston and Di Giulio, 1991). Catalase (CAT) is one of the enzymes in the first line of antioxidant defense. CAT converts hydrogen peroxide into water and oxygen. In addition, reduced glutathione (GSH)-dependent enzymes play a role in both detoxification and antioxidant processes. The glutathione-S-transferases (GST) are phase II detoxifying enzymes that catalyze the conjugation of GSH with a variety of electrophilic compounds. Besides its role as a co-substrate of GSH-dependent enzymes, GSH acts as a direct ROS scavenger contributing to the control of redox status (Cnubben et al., 2001). Therefore, the main goal of the present study was to determine whether exposure to MP, Gly, and Teb results in oxidative stress in *R. quelen*.

An additional goal of this study was to assess the histopathological lesions in the liver of *R. quelen* exposed to sublethal concentrations of MP, Gly, and Teb. Histopathological analysis has been proposed as an efficient and sensitive tool for the monitoring of pollution in water bodies (Costa et al., 2009).

Another tool for detecting eventual hepatic damage provoked by exposure to sublethal concentrations of MP, Gly, and Teb is the determination of the enzymes aspartate transaminase (AST, EC 2.6.1.1) and alanine transaminase (ALT, EC 2.6.1.2), which belong to the non-plasma-specific enzymes that can be found not only in blood plasma but also within the tissues of the liver, heart, gills, kidneys, muscles, and other organs. The activities of these serum enzymes are also used as significant stress indicators, and serve as conventional biomarkers of hepatotoxicity and liver damage generally related to changes in the histological structure of the hepatic tissue (El-Sayed et al., 2007).

According Ahmad et al. (2000), biochemical and oxidative stress parameters as well histopathology are useful biomarkers in aquaculture and environmental risk assessment. The combination of oxidative stress parameters, histopathology and liver enzymes are very interesting, while measures of oxidative stress are biomarkers of exposure, histopathological lesions and liver enzymes are biomarkers of effects (Kelly and Jarz, 2009).

A promising species for fish cultivation in southern South America and other subtropical climate regions of the world is the bagrid fish jundiá (*R. quelen*), a fish of the Heptapteridae family. The species was the subject of a number of research in our laboratory focusing on production systems, reproduction, stress response and toxicology (Barcellos et al., 2001, 2002, 2006, 2009; Silva et al., 2006, 2008; Soso et al., 2007), and also by other research groups (Crestani et al., 2007; Gluszcak et al., 2007; Cattaneo et al., 2008; Melo et al., 2008).

Thus, the aim of the present work was to verify whether MP, Gly, and Teb are potential oxidative stress inducers in *R. quelen*, and whether their effects could provoke histopathological changes in the liver of this fish species.

2. Material and methods

The experiment was conducted in March and April 2009 at the facilities of the Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul,

Brazil. We used 6-month-old, mixed-sex jundiá, *R. quelen* (Heptapteridae, Teleostei), juveniles weighing 115.7 ± 23.3 g (S.E.M., $n = 120$). The fish were kept in a 6200-L plastic tank prior to being transferred into experimental tanks under natural photoperiod, and were fed twice a day (10:00 and 16:00 h) with commercial extruded food at 5% of body weight (42% crude protein, 3400 kcal kg⁻¹ DE). The water temperature (26 ± 1 °C) and dissolved oxygen concentrations (5.6 – 7.5 mg L⁻¹) were measured with a YSI model 550A oxygen meter (Yellow Spring Instruments, USA). The pH values (6.6–7.0) (Bemauer pH meter), total ammonia-N (<0.5 mg L⁻¹) (colorimetric test), total alkalinity (60 mg L⁻¹ CaCO₃), and hardness (65 mg L⁻¹ CaCO₃) were also measured (all using colorimetric tests).

2.1. Experimental design

The agrichemicals tested in a sublethal concentration of 16.6% of the LC_{50-96h}, as previously determined by Kreutz et al. (2008), were methyl parathion (0.8 mg L⁻¹ of Folidol 600™), tebuconazole (0.88 mg L⁻¹ of Folicur 200 CE™), and glyphosate based herbicide (1.21 mg L⁻¹ of Roundup™). These three agrichemicals were reported as endocrine disruptors of the HPI axis by Cericato et al. (2008), with direct effects on adrenal cells (Cericato et al., 2009).

These concentrations were very plausible to enter water bodies since MP is used directly in water at concentrations ranging from 0.25 to 12.5 mg L⁻¹ (Williams and Jones, 1994), exceeding the concentration of 0.8 mg L⁻¹ used in the present study. Gly is also used directly in water bodies to control aquatic macrophytes at a concentration of 100 mg L⁻¹ (Monsanto®, 2003). Even when Gly and Teb are not used directly in water, they can easily enter water bodies in small concentrations (1.21 and 0.88 mg L⁻¹, respectively) when leached through rains or accidentally, as postulated by Soumis et al. (2003).

The experiment consisted of groups of *R. quelen* in 12 fiberglass tanks containing 1000-L chlorine-free, well-aerated tap water. Caution was taken to maintain a similar sex ratio in all replicates of all treatment groups. The fishes in tanks #1 to #3 did not receive any chemical contamination and were considered the control group. The water in the other nine tanks was artificially contaminated with 16.6% of the LC_{50-96h} of the three agrichemicals tested. The agrichemicals were previously diluted in water and then added to the water of the experimental tanks. In all tanks, the stocking density was 2.3 mg L⁻¹, similar to the stocking density postulated as non-stressful for *R. quelen* (Barcellos et al., 2001), and fish were acclimated to the tanks for a 3-d period before experimental water contamination. To maintain a density as low as 2.3 g L⁻¹ four fish were kept in each fiberglass tank, filled with approximately 200 L of water. All fish were sampled the “n” number for each parameter evaluated was 12.

After 96 h of exposure (or not), all the fish were sampled. The experiment was carried out in a static test design without water changes and agrichemical replacement. The experiment follows the protocol commonly used for acute toxicity studies (Kreutz et al., 2008) with single exposure to the substance.

The fish in the present study were fed three times during the 96 h of exposure (at 24, 48, and 72 h after the start of exposure to the agrochemicals) at a rate of 0.75% of biomass. To prevent stress due to the introduction of cleaning equipment, food residues and feces were not removed. The water quality was monitored daily by determining the DO, pH, and total ammonia.

2.2. Chemicals

The agrichemicals used were: the fungicide tebuconazole (2-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol), the pesticide methyl parathion (O-O-dimethyl

O-4-nitrophenyl thiophosphate), and a commercial formulation containing the herbicide glyphosate (N-phosphonomethylglycine). All agrichemicals were obtained commercially. Acetylthiocholine (ATC), 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), bovine serum albumin, Triton X-100, hydrogen peroxide (H_2O_2), malondialdehyde (MDA), 2-thiobarbituric acid (TBA), and sodium dodecyl sulfate (SDS) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3. Sampling

Fish were anesthetized by administering buffered (NaH_2CO_3) MS222 (300 mg L^{-1}) into the tank. After loss of orientation and complete immobilization, the fish were captured, and blood samples (0.1–0.30 mL) were taken from severed caudal peduncle using sterile microhematocrit tubes. The time elapsed from anesthesia administration to blood collection did not exceed 1 min. The tubes were centrifuged (3000g, 10 min) in a microhematocrit centrifuge; the plasma was collected using a Hamilton syringe, transferred to Eppendorf tubes, and stored at -25°C .

After blood collection, the fishes were killed by spinal section and decapitation, and then dissected for tissue collection. Liver tissue was immediately conserved in Bouin's solution or frozen in liquid nitrogen, and stored for posterior analysis.

After sampling, all dead fishes were frozen and then shipped to the biological garbage collector. After the experiment, the contaminated water was kept for at least 30 d in fiberglass tanks and then percolated in septic ponds. The tanks were then cleaned with running water, followed by rinsing with ethanol. Before reusing, the tanks were filled with water and tested for remaining toxicity by adding *R. quelen* fingerlings that were observed for at least 5 d for mortality or behavioral changes.

2.4. Protein determination

The protein levels were spectrophotometrically estimated by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.5. Parameters evaluated

2.5.1. Oxidative stress parameters

2.5.1.1. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels. The peroxides produced can be indirectly quantified by a TBARS assay, which is believed to reflect the intensity of lipid peroxidation by quantifying one of its main end products – malonic dialdehyde (Lushchak et al., 2009). This is performed by a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA), which is optically measured. Tissue samples were homogenized with 10% trichloroacetic acid using a motor-driven Teflon pestle and centrifuged at 1000g for 10 min. Liver homogenates (100–400 μL) were added to 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M acetic acid (pH 3.4), and 0.8% thiobarbituric acid; the final volume was adjusted to 2.0 mL. The reaction mixture was placed in a microcentrifuge tube and incubated for 90 min at 95°C . After cooling, it was centrifuged at 5000g for 10 min, and optical density was determined at 532 nm. TBARS levels are expressed as nmol MDA per mg of protein, according to Ohkawa et al. (1979).

2.5.1.2. Protein carbonyl assay. Liver tissue was homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, using a glass homogenizer. The protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995), with some modifications. Briefly, homogenates were diluted to 0.7–0.8 mg mL^{-1} of protein in each sample, and 1-mL aliquots were mixed with 0.2 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (10 mM DNPH) or 0.2 mL

HCl 2 M. After incubation at room temperature for 1 h in a dark room, 0.5 mL of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing SDS 3%), 2.0 mL of heptanes (99.5%), and 2.0 mL of ethanol (99.8%) were added sequentially, mixed with vortex agitation for 40 s, and centrifuged for 15 min. Next, the protein isolated from the interface was washed two times with 1 mL of ethyl acetate/ethanol, 1:1 (v v⁻¹), and suspended in 1 mL of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Femto Scan spectrophotometer against the corresponding sample (blank), and total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of $22\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

2.5.1.3. Enzymatic defense antioxidant system.

2.5.1.3.1. Catalase assay. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assayed by ultraviolet spectrophotometry (Nelson and Kiesow, 1972). Samples of liver were homogenized in a Potter-Elvehjem glass/Teflon homogenizer with 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 (with 0.1% Triton X-100 and 150 mM NaCl) (1:20 dilution), centrifuged at 10 000g for 10 min at 4°C . Briefly, the assay mixture consisted of 2.0 mL potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), 0.05 mL H_2O_2 (0.3 M), and 0.05 mL homogenate. Changes in H_2O_2 absorbance in 60 s were measured at 240 nm. Catalase activity was calculated in terms of $\mu\text{mol mg}^{-1}\text{ protein min}^{-1}$.

2.5.1.3.2. Glutathione-S-transferase. The glutathione S-transferase (GST) activity was determined using the method of Habig et al. (1974). The reaction mixture consisted of 33 mM Hepes buffer (pH 7.5), 1.5 mM GSH, 1.5 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB, and water in a total volume of 1 mL. The conjugation of GSH with CDNB via GST activity was recorded spectrophotometrically at 340 nm during 3 min. The activity was expressed as nmol of CDNB conjugate formed $\text{min}^{-1}\text{ mg}^{-1}\text{ protein}$.

2.5.1.4. Non-enzymatic anti-oxidants.

2.5.1.4.1. Ascorbic acid. Ascorbic acid in the brain and liver was determined at 524 nm. Briefly, brain and liver samples were homogenized (1:10 w/v) in 20% TCA and centrifuged at 11 300g for 3 min. Samples (250 μL) of the supernatant were mixed with 250 μL of water plus 25 μL 0.02% 2,6-dichlorophenolindophenol and incubated for 1 h at room temperature. After that, 250 μL of a 2% thiourea and 5% metaphosphoric acid solution plus 250 μL of 0.2% dinitrophenylhydrazine in 12 M sulfuric acid were added. The reaction tubes were incubated in a water bath at 60°C for 3 h. Following the incubation, 500 μL of 18 M sulfuric acid was added, and the tubes were centrifuged at 500g for 10 min. The absorbance was read, compared to a standard containing 100 nmol of ascorbic acid, and expressed in $\mu\text{mol g}^{-1}$ of tissue (Carr et al., 1983).

2.5.1.4.2. Non-protein thiols. Non-protein thiols levels were determined in the liver by the method of Ellman et al. (1961). Tissue (100 mg) was precipitated with Tris HCl 50 mM (pH 7.5), followed by centrifugation at 3000g for 10 min. An aliquot of the supernatants (1.0 mL) mixed with 10% trichloroacetic acid were centrifuged and then a new aliquot of this supernatant (400 μL) is used the determination with 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 10 mM (DTNB), Phosphate buffer 0.5 mM (pH 6.8), cystein 0.5 mM and the reaction was followed at 412 nm. Non-protein thiols levels were expressed as $\mu\text{mol SH g}^{-1}$ of liver.

2.5.1.4.3. Reduced glutathione (GSH). GSH was determined by the colorimetric method. The total blood sample (50 μL) was hemolyzed in 500 μL water, and 750 μL of a precipitation solution (1.67 g metaphosphoric acid, 0.2 g EDTA, and 30 g NaCl for 100 mL of distilled water) were added. After this, the mixture was centrifuged at 11 300g for 3 min. One aliquot (500 μL) was drawn from the supernatant, and 2 mL of 0.3 M $Na_2P_2O_4$ plus 250 μL of 0.02% 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) were added. GSH was read at 412 nm, compared with a standard

Table 1

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), carbonyl protein, reduced glutathione (GSH), non-protein thiols, ascorbic acid, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in liver of *Rhamdia quelen* exposed to sublethal concentrations of methyl-parathion (MP), glyphosate (Gly) and tebuconazole (Teb) for 96 h.

| | Unit | Control | MP | Gly | Teb | Statistics |
|----------------------------------|---|-------------|---------------|---------------|---------------|------------------------------------|
| TBARS | nmol TBARS mg ⁻¹ protein | 1.82 ± 0.16 | 2.85 ± 0.25* | 2.06 ± 0.13 | 2.89 ± 0.2 | 0.0003, F _{3,36} = 8.206 |
| Carbonyl protein | nmol carbonyl mg ⁻¹ protein | 9.97 ± 0.34 | 9.61 ± 0.22 | 10.1 ± 0.53 | 13.3 ± 0.69 | 0.0001, F _{3,36} = 13.026 |
| Reduced glutathione | nmol mg ⁻¹ protein min ⁻¹ | 0.90 ± 0.15 | 2.25 ± 0.29* | 5.14 ± 0.57** | 2.07 ± 0.16* | 0.0001, F _{3,36} = 28.553 |
| Non-protein thiols | μmol g ⁻¹ wet tissue | 0.24 ± 0.01 | 0.27 ± 0.10 | 0.28 ± 0.02 | 0.34 ± 0.03 | 0.6259, F _{3,36} = 0.6072 |
| Ascorbic acid | μmol g ⁻¹ wet tissue | 0.96 ± 0.06 | 2.12 ± 0.08** | 1.94 ± 0.06** | 2.73 ± 0.06** | 0.0001, F _{3,36} = 12.402 |
| Alanine aminotransferase (ALT) | IU dL ⁻¹ | 14.0 ± 2.97 | 16.7 ± 4.24 | 17.5 ± 5.78 | 13.8 ± 3.58 | 0.8878, F _{3,36} = 0.2115 |
| Aspartate aminotransferase (AST) | IU dL ⁻¹ | 111 ± 5.86 | 198 ± 21.6* | 111 ± 10.1 | 241 ± 23.4* | 0.0001, F _{3,36} = 14.874 |

Data represent the mean ± S.E.M. (n = 10). Asterisks indicates difference between groups and control values (ANOVA followed by Dunnett's test).

* P < 0.05.

** P < 0.01.

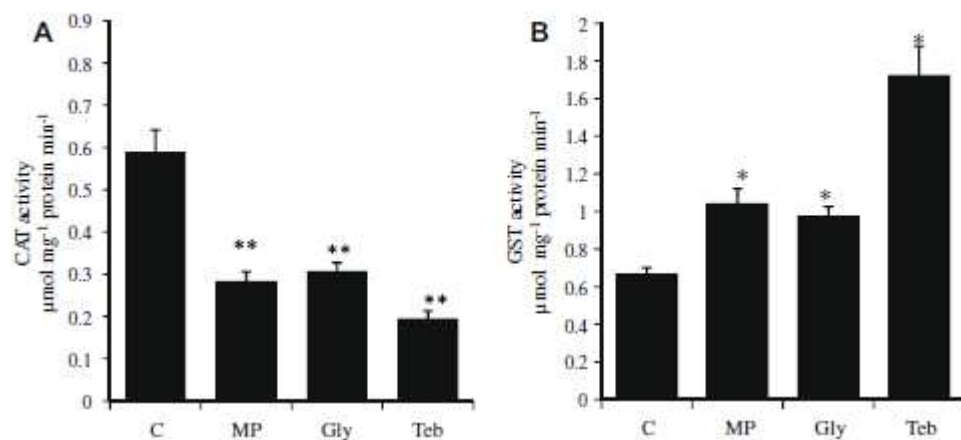


Fig. 1. Hepatic activity of (A) Catalase and (B) glutathione-S-transferase (GST) in liver of *Rhamdia quelen* exposed to sublethal concentrations of methyl-parathion (MP), glyphosate (Gly) and tebuconazole (Teb) for 96 h. Data represent the mean ± S.E.M. (n = 10). * Indicates difference between groups and control values (ANOVA followed by Dunnett's test, *P < 0.05; **P < 0.01).

solution containing 100 nmol of the GSH, and expressed in nmol mg⁻¹ total hemoglobin (Beutler, 1984).

2.5.2. Histopathological analysis

2.5.2.1. Descriptive approach. For histological examination, fish were killed and liver tissue were removed immediately to overcome autolysis; then they were fixed in Bouin's solution (Roberts, 2001), dehydrated through graded series of ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Sections that were 5–6 mm thick were prepared from paraffin blocks using a Reichert microtome. These sections were then stained with hematoxylin–eosin. Histopathological changes were examined under a Leica DME100 light microscope.

2.5.2.2. Quantitative approach. Semi-quantitative analysis of liver histological changes in the control fish and in the *R. quelen* exposed to MP, Gly, and Teb was done on an arbitrary scale of 0 to +++, relative to how widespread the changes detected were considering the four fish analyzed by treatment group. Therefore, 0 represented complete absence of lesions, and +++ the most widespread (extremely frequent) lesions or structural alterations. Due to the subjective nature of the interpretations of the histopathologic effects caused by toxicants, observations were limited to specific and clearly distinguishable changes.

2.5.3. Serum transaminases

Hepatic toxicity was also monitored by quantitative analysis of the serum AST and ALT activities, which were used as biochemical

markers of liver damage. AST and ALT levels were determined using UV kinetic methodology in commercial kits (ALT/GTP Liquiform, catalogue number 74-4/30, and AST/GOT Liquiform, catalogue number 75-4/30; Labtest, SP, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Enzyme activity was expressed in International Units per liter (IU L⁻¹).

2.6. Statistics

The mean ± S.E.M. of each group was calculated, and ANOVA followed by Dunnett's test was used to compare each value against the control value using the GraphPad InStat 3.00 statistical package (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was accepted at p < 0.05. Hartley's test was carried out to verify the homogeneity of variance, and normality was tested using the Kolmogorov–Smirnov test.

3. Results

Exposure to sublethal concentrations of MP, Gly, and Teb did not alter the survival rate (100% for all treatments) of *R. quelen*.

The water quality parameters measured in all experimental tanks did not vary in function with the treatment (control and agricultural exposure) and were as follows: temperature, 26 ± 1 °C; dissolved oxygen, 5.6–7.5 mg L⁻¹; pH values, 6.8–7.0; total ammonia-N, under to 0.5 mg L⁻¹; total alkalinity, 60 mg L⁻¹ CaCO₃; and total hardness, 65 mg L⁻¹ CaCO₃.

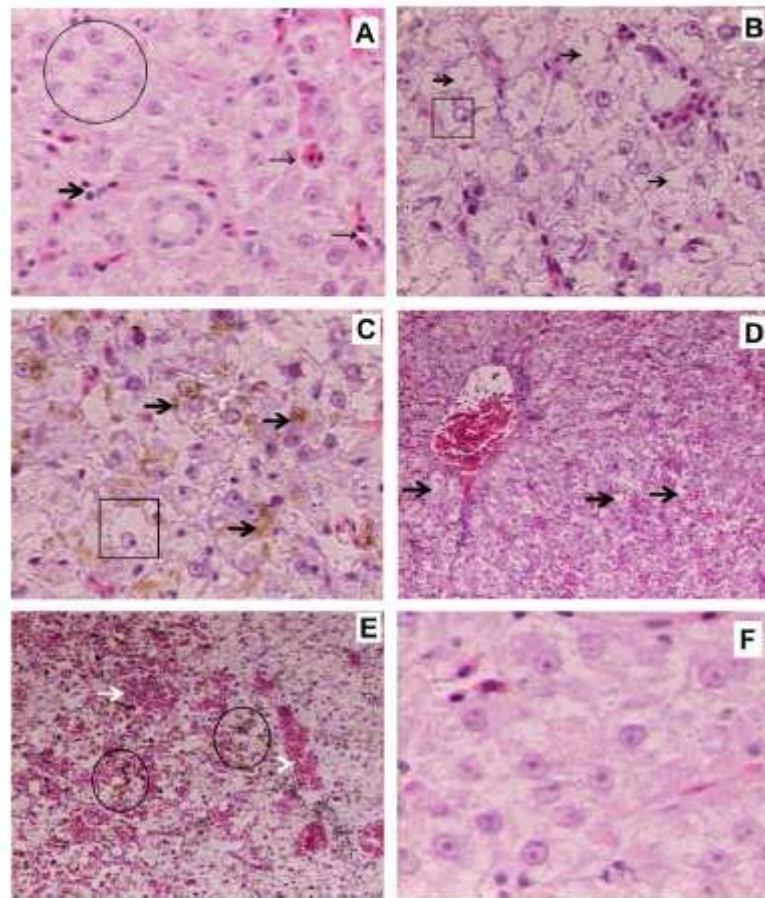


Fig. 2. Photomicrograph of the hepatic tissue of *Rhamdia quelen* exposed to methyl-parathion, tebuconazole or glyphosate (H&E). (A) Normal hepatic tissue from control fish, showing hepatocytes (circle), sinusoid (arrow) and bile canaliculum (large arrow), 400 \times . (B) Hepatocyte degeneration (square) and necrosis (arrows) in fish exposed to tebuconazole, 400 \times . (C) Bile stagnation (arrow) and hepatocyte degeneration (square) in fish exposed to tebuconazole 400 \times . (D) Diffused hepatic degeneration in fish exposed to methyl parathion, 100 \times . (E) Hemorrhage (arrow), congestion (arrow head) and bile stagnation (circle) in fish exposed to methyl parathion, 100 \times . (F) Normal hepatic tissue from glyphosate exposed fish, 400 \times .

The liver of *R. quelen* exposed to MP and Teb showed enhanced TBARS levels, higher than (56% and 59%, respectively) the control fish (Table 1). Gly did not alter TBARS generation in the liver of *R. quelen*. The protein carbonyl content increased (34% when compared to the control fish; Table 1) only in *R. quelen* exposed to tebuconazole.

R. quelen exposed to MP, Gly, and Teb showed significant decrease of CAT activity (52%, 48%, and 67%, respectively) when compared to the control group (Fig. 1A). The GST activity in the liver of fish exposed to MP, Gly, and Teb was significantly increased (57%, 46% and 160%, respectively) when compared to the control group (Fig. 1B). As shown in Table 1, fish exposed to MP, Gly, and Teb showed significantly higher GSH concentrations (151%, 472%, and 130%, respectively, when compared with the control levels). The non-protein thiols content increased (42% when compared to the control fish) only in *R. quelen* exposed to tebuconazole. Ascorbic acid increased significantly in *R. quelen* exposed to MP, Gly, and Teb (121%, 102%, and 184%, respectively, when compared with the control levels). As shown in Table 1, in MP- and Teb-exposed fish, serum AST increased significantly, while Gly-exposed fish showed serum AST values similar to that in the controls. In terms of serum ALT levels, MP-, Gly- and Teb-exposed *R. quelen* showed no significant difference from the control group (Table 1).

Table 2

Histological alterations found in the liver of *R. quelen* following acute exposure (96 h) to methyl-parathion (MP), glyphosate based herbicide (Gly) and tebuconazole (Teb) or only to water (C), their respective stages of damage to the tissue and frequency of occurrence.

| Alterations | Stage | C | MP | Gly | Teb |
|--------------------------|-------|---|------|------|------|
| Cellular hypertrophy | I | + | ++++ | ++++ | +++ |
| Nuclear hypertrophy | I | 0 | ++++ | +++ | ++ |
| Cytoplasmic vacuoles | I | 0 | ++ | +++ | ++++ |
| Nuclear vacuoles | II | 0 | ++ | + | ++++ |
| Cytoplasmic degeneration | II | + | ++ | + | ++++ |
| Nuclear degeneration | II | + | ++ | + | ++++ |
| Bile stagnation | II | + | ++ | + | ++++ |
| Hyperemia | II | 0 | +++ | 0 | +++ |
| Pyknotic nuclei | II | 0 | + | 0 | ++ |
| Hepatocyte necrosis | III | 0 | 0 | 0 | ++ |

Note: 0 = absent; + = fairly frequent; ++ = frequent; +++ = very frequent; ++++ = extremely frequent.

Regarding the histopathology, fish exposed to MP and Teb showed several pathological changes in the liver. The most frequent alterations were: diffused hepatocyte degeneration (Fig. 2D); bile stagnation, which was identified as brownish-yellow

granules in the cytoplasm (Fig. 2C); hyperemia, that is, increased bloodflow in the liver (Fig. 2E); and vacuoles in the cytoplasm (Fig. 2B) and nucleus (Fig. 2B). The liver of Gly-exposed *R. quelen* did not show any visible histological changes.

Table 2 depicts the quantitative analysis of histological lesions found in *R. quelen* exposed to MP, Gly, and Teb. Fish exposed to Teb presented a higher frequency of histological changes.

4. Discussion

The present work reports for the first time the toxicity of the pesticide methyl parathion (MP) and of the fungicide tebuconazole (Teb) in *R. quelen*, and as in other works, suggests the relative low liver toxicity of glyphosate based herbicides in the same fish species (Gluszczak et al., 2007) and others (Lushchak et al., 2009).

Despite the induction of an increase in some non-enzymatic anti-oxidants such as reduced glutathione (GSH), ascorbic acid levels, and also in the antioxidant enzyme glutathione-S-transferase (GST), both MP and Teb clearly induce a situation of oxidative stress in the liver, with a significant increase in lipid peroxidation (LPO).

As reviewed by Ahmad et al. (2004), LPO is one of the main processes induced by oxidative stress from xenobiotics such as pesticides, herbicides, and fungicides, as has been observed in several fish species. The elevated TBARS generation in the liver prompted by the exposure of fish to MP and Teb is a clear indication of LPO, since it reflects the intensity of lipid peroxidation by quantifying one of its main end products – malonic dialdehyde (Lushchak et al., 2009). The increased TBARS levels after agricultural exposure were similar to those observed in *R. quelen* exposed to the herbicide clomazone (Crestani et al., 2007). In *Brycon cephalus*, MP is also an oxidative stress-inducing substance, but in contrast to our results, where the effect was in the liver, in *B. cephalus* the gills and white muscle are the most sensitive organs (Monteiro et al., 2006).

The absence of Gly effect in TBARS generation can be due to the fact that in the present study Gly not affects some of the anti-oxidants measured. The present results indicate that *R. quelen* exposed to Gly resist to oxidative stress through other antioxidant mechanisms, preventing an increase LPO. In the present study, CAT activity was decreased by Gly; thus, the compensatory response might be due to the extremely high elevation of GSH content (472% higher than the control GSH levels). Despite the absence of Gly-induced oxidative stress, our data clearly suggest that both GSH content and GST activity might be reliable biomarkers for Gly exposure.

Other biomarkers of oxidative stress include xenobiotic-induced oxidative modifications in proteins (Sayeed et al., 2003). The ROS generated in the oxidative stress process are considered to be responsible for the formation of carbonyl groups in proteins (Oliver, 1987). Only Teb induced a significant increase in protein carbonyl content. In agreement with the proposed role of carbonyl protein as a cellular damage indicator, Teb induced the more severe hepatic lesions (see Table 2). As in the present work, the exposure of other fish species to agricultural chemicals resulted in an increase in liver protein carbonyl (Parvez and Raisuddin, 2005; Miron et al., 2008).

The reduction in CAT activity in the liver verified in the present work demonstrates that MP and Teb induce peroxidative damage in the liver through the alteration of the levels of this enzymatic antioxidant. Crestani et al. (2007) also found a reduction in CAT activity in the liver of *R. quelen* exposed to clomazone. CAT activity decreases are reported in a number of other studies of fish exposure to xenobiotics (Pandey et al., 2001; Sayeed et al., 2003; Crestani et al., 2007), correlating the enhanced liver LPO with suppressed CAT activity.

GST increases after pollutant exposure is an expected response because GST is involved in the biotransformation of several pollutants (Wang et al., 2009). The GST increases verified in the present work were in agreement with the findings of Alves et al. (2002), who stated that exposure to pesticides can elicit pro-oxidant conditions that trigger adaptive responses such as increases in the activity of the antioxidant enzymes, and suggests that the detoxification processes were increased. However, contrary to what was verified in the present work, in some fish the GST is inhibited by exposure to oxidative stress inducers and toxic substances (Monteiro et al., 2006; Li et al., 2008; Wang et al., 2009). *R. quelen* exposed to MP and Teb showed high LPO with high levels of GST activity. Taken together, these results suggest that an increase in GST activity is not sufficient to neutralize the oxidative potential of MP and Teb.

No data were found in the literature focusing on eventual Teb potential to induce oxidative stress and hepatotoxicity in fish. Despite the lack of information about oxidative stress and the hepatotoxicity potential of Teb in fish, paclobutrazole, another agricultural in the azole group, was reported to be an inducer of oxidative stress in *D. rerio*, disrupting the pro-oxidant-antioxidant balance through the inhibition of CAT (Ding et al., 2009). This mechanism is similar to what the present study found regarding Teb. In addition, another azole fungicide, tricyclazole, was recently found to cause some metabolic changes, and a marked increase in ALT and AST activity in *D. rerio* (Sancho et al., 2009), which may indirectly suggest a potential of this compound to induce hepatic damage.

The oxidative stress situation induced in *R. quelen* liver by MP and Teb led to significant histological damage, such as lesions, in liver parenchyma, as confirmed by the increased levels of AST. *R. quelen* exposed to MP and Teb showed significantly increased serum AST activity, which serves as a conventional biomarker of hepatotoxicity (Venkateswara Rao, 2006). Likewise, El-Sayed et al. (2007) observed a significant increase in AST levels in Nile tilapia exposed to deltamethrin. MP and Teb were able to induce enzyme leakage and, consequently, hepatic damage.

Pathological changes in fish are powerful indicators of exposure to environmental stressors. However, studies concerning the effects of pesticide exposure on tissue histopathology are scarce (Sepici-Dinçel et al., 2009). In the present study, MP caused several cell alterations in the hepatic tissue of *R. quelen*, since the hepatic parenchyma is a target of the toxic action of this molecule and more frequently suffers a major incidence of cellular disorganization and necrosis. Similar hepatic histological lesions were also found in *R. quelen* exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), clomazone and MP (Crestani et al., 2007; Cattaneo et al., 2008; Melo et al., 2008) and in other fish species exposed to chemical pollutants (Dutta et al. 1993; Rodrigues and Fanta, 1998; Uguz et al., 2003; Sepici-Dinçel et al., 2009).

The histopathological observations in the present study provide evidence that MP and Teb can induce liver histological lesions and alterations, and that the elevation of lipid peroxidation and the free radicals generated in the oxidative process are involved in hepatic cell injury. Cell damage induced by exposure to toxic substances was verified by several authors in several fish species, including jundiá (Crestani et al., 2007; Cattaneo et al., 2008; Melo et al., 2008). These authors suggest that alterations occur because the liver is the metabolic center for detoxification, and the presence of these substances could affect the metabolic process and produce pathological lesions. In the present work, we verified that both MP and Teb increase the production of reactive oxygen species (ROS) generation, and disruption of the balance between oxidants and anti-oxidants. The enhanced lipid peroxidation suggests that ROS-induced oxidative damage in the liver cells can be one of the toxic effects of MP and Teb. In a review, Scandalios (2005) pos-

tulated that enhanced ROS generation and the consequent oxidative stress induce molecular damage in lipids, proteins, and nucleic acids, which in turn triggers cellular effects such as damage in the membrane and organelles. These alterations are reflected in histological changes and cell death (necrosis).

The present study demonstrates that MP and Teb have a high oxidative stress-inducing potential in *R. quelen* and that the liver is a sensitive target organ. Comparing both toxicants, the results show that Teb seems to be the more toxic of the tested substances and induces severe hepatic lesions. In summary, the data presented herein demonstrate that the sublethal concentrations of methyl parathion and tebuconazole used in agricultural fields cause changes in oxidative stress parameters as well as hepatic cell injuries in *R. quelen*, and that these parameters have the potential to be used as bioindicators of exposure to these agrichemicals.

References

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta* 1523, 37–48.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and enzymatic antioxidants as an adaptation to phagocytes induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 290–295.
- Almeida, L.C., Aguiar, L.H., Moraes, G., 2005. Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinjá (*Brycon cephalus*). *Ciência Rural* 35, 1412–1416.
- Alves, S.R.C., Severino, P.C., Ibbotson, D.P., 2002. Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Mar. Environ. Res.* 54, 1–5.
- Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Krieger, M.H., Quevedo, R.M., Lulhier, F., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfishes. *Aqua. Res.* 32, 123–125.
- Barcellos, L.J.G., Wassermann, G.F., Scott, A.P., Woehl, V.M., Quevedo, R.M., Itzáis, I., Krieger, M.H., Lulhier, F., 2002. Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. *J. Fish. Biol.* 61, 751–763.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* 253, 317–321.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., 2009. Influence of color background and shelter availability on jundiá (*Rhamdia quelen*) stress response. *Aquaculture* 288, 51–56.
- Beuder, E., 1984. Red Cell Metabolism; Manual of Biochemical Methods, third ed. Grune & Stratton Inc., 187p.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Carr, R.S., Bally, M.B., Thomas, P., Neff, J.M., 1983. Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. *Anal. Chem.* 55, 1229–1232.
- Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., Silveira, P.A., Luz, L., Miron, D.S., Moraes, M.B., Moraes, B.S., Claxen, B., 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92, 133–137.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Pinco, J., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E.S., Anziliere, Deniz, Barcellos, L.J.G., 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol.* C 148, 281–286.
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Marquize, A., Barcellos, L.J.G., 2009. Responsiveness of the interrenal tissue of jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol.* C 149, 363–367.
- 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.
- Costa, P.M., Diniz, M.S., Castro, S., Ioba, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Gaetano, M., Vale, C., Del Valle, T.A., Costa, M.H., 2009. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solen senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. *Aquat. Toxicol.* 92, 202–212.
- Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., Miron, D.S., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67, 2305–2311.
- Ding, F., Song, W.H., Guo, J., Gao, M.L., Hu, W.X., 2009. Oxidative stress and structure-activity relationship in the zebrafish (*Danio rerio*) under exposure to padobutrazol. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 44, 44–50.
- Dutta, H.M., Richmonds, C.R., Zeno, T., 1993. Effects of diazinon on the gills of Bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *J. Environ. Path. Toxicol. Oncol.* 12, 219–227.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochim. Pharmacol.* 7, 88–95.
- El-Sayed, Y.S., Saad, T.T., El-Bahr, S.M., 2007. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 24, 212–217.
- Glusczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., Moraes, M.B., Pedron, F.A., Duarte, M.P., Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 237–241.
- Glusczak, 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.* C 146, 519–524.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hussar, G.J., Paradelo, A.L., Jonas, T.C., Serra, W., Gomes, J.P.R., Peres, M.R., 2004. Experiments to determine the tebuconazole doses (Folicur 200 CE) on the behaviour of tilapia (*Tilapia rendalli*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Eng. Amb.* 1, 35–44.
- Kelly, J.M., Janz, D.M., 2009. Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. *Aquat. Toxicol.* 92, 240–249.
- Kjaerstad, M.B., Taxvig, C., Nellemann, C., Vinggaard, A.M., Andersen, H.R., 2008. Do azole fungicides possess an endocrine disrupting hazard? *Toxicol. Lett.* 180S, S32–S46. doi:10.1016/j.toxlet.2008.06.435.
- 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*). *Aquat. Toxicol.* 80, 372–381.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliere, D., Martins, D., Iorenson, M., Martencange, A., Silva, L.B., 2008. Acute toxicity testing of agricultural pesticides on silver catfishes (*Rhamdia quelen*), fingerlings. *Ciência Rural* 38, 1050–1055.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* C 147, 222–231.
- Li, H., Jiang, H., Gao, X., Wang, X., Qu, W., Lin, R., Chen, J., 2008. Acute toxicity of the pesticide methomyl on the topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*): mortality and effects on four biomarkers. *Fish. Physiol. Biochem.* 34, 209–216.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932–937.
- Melo, G.C., Donatti, L., Rudnik, C.A.M., Fanta, E., 2008. Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Iodol 600. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 821–829.
- Miron, D.S., Pretto, A., Crestani, M., Glusczak, L., Schetinger, M.R., Loro, V.L., Morsch, V.M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74, 1–5.
- Monsanto®, 2003. Background: Aquatic Use of Glyphosate Herbicides in Australia. <http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/gly_austfro_g_bg.pdf> (downloaded 22.10.09).
- Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.J.L., Chaves, L.S., Ferreira-Gravo, M., Lima, J.V., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* C 146, 221–234.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.I., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folsiper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol.* C 143, 141–149.
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474–478.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Oliver, C.N., 1987. Inactivation of enzymes and oxidative modification of proteins by stimulated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 62.
- Pandey, S., Ahmad, I., Parvez, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2001. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: I. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 345.
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyl: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112–117.
- Roberts, R.J., 2001. Fish Pathology, third ed. Saunders, London, p. 492.
- Rodriguez, E.L., Fanta, E., 1998. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoate 500. *Rev. Bras. Zool.* 15, 441–450.
- Sanchez, O.A., Parabá, L.C., Jansson, C.M., Carrasco, J.M., 2008. Bioconcentration of tebuconazole fungicide in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Lett.* 180S (2008), S32–S46. doi:10.1016/j.toxlet.2008.06.213.
- Sancho, E., Vega, C.F., Villarreal, M.J., Moliner, E.A., Ferrando, M.D., 2009. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. *Comp. Biochem. Physiol.* C 150, 25–32.

- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Rizwanul, H., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 295–301.
- Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995–1014.
- Sepici-Dingel, A., Benli, A.Ç.K., Selvi, M., Sarikaya, H., Sahin, D., Ozkul, I.A., Erkoç, F., 2009. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicol. 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., Bedin, A., 2006. Alternative species for traditional carp polyculture in southern South America: initial growing period. *Aquaculture* 255, 417–428.
- Silva, L.B., Barcellos, L.J.G., Quevedo, R.M., Souza, S.M.G., Kessler, A., Kreutz, L.C., Ritter, F., Finco, J., Bedin, A., 2008. Introduction of jundiá *Rhamdia quelen* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* increase productivity of traditional carp polyculture in southern South America. *Aqua. Res.* 39, 542–551.
- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Silva, L.B., Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 308–313.
- Sourdis, N., Lucotte, M., Sampaio, D., Almeida, D.C., Giroux, D., Morais, S., Pichet, P., 2003. Presence of organophosphate insecticides in fish of the Amazon river. *Acta Amazon.* 33, 325–338.
- Southorn, P., Powis, G., 1988. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo Clin. Proc.* 63, 390–408.
- Uguz, C., Iscan, M., Ergilven, A., Isgor, B., Togan, I., 2003. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Res.* 92, 262–270.
- 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.
- Venkateswara Rao, J., 2006. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere* 65, 1814–1820.
- Walton, W.J., Brown, K.L., Lydy, M.J., 1997. Diurnal fluctuations in toxicity in two fishes species: *Gambusia affinis* and *Notropis hubbsi*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 414–421.
- Wang, C., Lu, G., Cui, J., Wang, P., 2009. Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28, 414–419.
- Williams, H.H., Jones, A., (Eds.), 1994. *Parasitic Worms of Fish*. Taylor and Francis, London, 593p.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Van, L.J., Traiber, 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.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho relatou pela primeira vez, a toxicidade do pesticida metil paration (MP) e do fungicida tebuconazole (TEB) em jundiás (*Rhamdia quelen*), também sugere a baixa toxicidade no fígado desta espécie dos herbicidas a base de glifosato, assim como outros trabalhos na mesma espécie (GLUSCZAK *et al.*, 2007) e outras (LUSHCHAK *et al.*, 2009).

Mostra também que os efeitos dos agroquímicos testados causam não somente efeitos deletérios a níveis toxicológicos, mas também a níveis histopatológicos.

Este trabalho relatou um aumento dos níveis de antioxidantes não enzimáticos como GSH, níveis de ácido ascórbico e de GST, mostrando que MP e TEB provocam uma situação de estresse oxidativo no fígado de *R. quelen*, com significativo aumento de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode ser devido a um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e pró-oxidante gerado pela toxicidade dos herbicidas. A LPO é um dos principais processos de indução de estresse oxidativo por xenobióticos (ALVES *et al.*, 2004). A geração de TBARS no fígado causados pela exposição dos peixes a MP e TEB é uma clara indicação de LPO. Crestani *et al.* (2007) também observaram aumento nos níveis de TBARS em *R. quelen* expostos ao herbicida clomazone. A ausência de efeito em GLI na geração de TBARS pode ser pelo fato de que o GLI não afeta os antioxidantes medidos neste trabalho. *R. quelen* expostos ao GLY resistem ao estresse oxidativo através de outros mecanismos antioxidantes, evitando um aumento de LPO.

Variações na atividade de enzimas antioxidantes têm sido utilizadas como indicadores de estresse oxidativo mediado por poluentes (AHMAD *et al.*, 2000; SAYEED *et al.*, 2003). Nosso estudo observou, em *R. quelen*, uma diminuição na atividade da CAT, quando exposto ao GLI, a resposta compensatória pode ser devido a elevação dos níveis de GSH. Nossos dados sugerem que o conteúdo de GSH e atividade de GST podem ser confiáveis biomarcadores para exposição a glifosato. GST tem função importante na proteção dos tecidos contra os efeitos de xenobióticos (MONTEIRO *et al.*, 2006; FERRARI *et al.*, 2007). Modesto & Martinez (2010) observaram aumento na atividade da GST em fígado de *Prochilodus lineatus* após 24 e 96 horas de exposição ao Roundup[®].

Apenas tebuconazole induziu um aumento significativo da carbonilação de proteínas. Como o papel da proteína carbonil é ser um indicador de dano celular, o TEB está dentro dos efeitos esperados, pois induziu graves lesões hepáticas. Nosso trabalho está de acordo com

Parvez e Raisuddin (2005) e Miron et al. (2008), que também descreveram um aumento da proteína carbonil em outras espécies de peixes também expostos a agrotóxicos.

A redução da CAT verificada neste estudo demonstra que MP e TEB provocam danos de peroxidação no fígado, os resultados de nossos estudos vem de encontro aos demonstrados por Crestani et al. (2007), que também encontraram uma na atividade da catalase no fígado de *R. quelen* expostos ao clomazone. GST tem função importante na proteção dos tecidos contra os efeitos de xenobióticos (MONTEIRO *et al.*, 2006; FERRARI *et al.*, 2007). Os efeitos dos poluentes com relação à atividade desta enzima tem sido inconclusivos, pois mostram indução, não alteração ou inibição (BALLESTEROS *et al.*, 2009). O aumento de GST após uma exposição a poluentes é uma resposta esperada, pois a GST está envolvida no processo de biotransformação de diversos poluentes. O aumento de GST verificado nesse trabalho está de acordo com Alves et al. (2002) que informa que exposição a pesticidas pode provocar condições pró-oxidantes que desencadeiam respostas adaptativas, como aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Ao contrário do que foi verificado neste trabalho, em alguns peixes a GST é inibida por exposição a indutores de estresse oxidativo e de substância tóxicas (MONTEIRO *et al.*, 2006, LI *et al.*, 2008).

Não foram encontrados dados na literatura sobre o possível potencial de tebuconazole de induzir estresse oxidativo e hepatotoxicidade em peixes. Apesar da falta de informações, outro agroquímico do grupo azol, foi relatado como indutor de estresse oxidativo em *Danio rerio*, interrompendo o equilíbrio pró-oxidante-antioxidante através da inibição da CAT (DING *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo depende da intensidade e duração do estresse aplicado, bem como da suscetibilidade da espécie ao composto exposto em que pode levar ao aumento ou inibição de enzimas antioxidantes. A situação de estresse oxidativo induzido no fígado de *R. quelen* por MP e TEB levaram a lesões histopatológicas significantes, como lesões em parênquima hepático, confirmado pelo aumento dos níveis de AST. A exposição de *R. quelen* ao MP e TEB aumentou significativamente na atividade de AST, que serve como um marcador biológico de hepatotoxicidade. Este aumento também foi verificado em tilápia do Nilo expostos a deltametrina por El-Sayed et al. (2007).

Alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HINTON & LAURÉN, 1990; HINTON *et al.*, 1992). As alterações histopatológicas em tecidos de peixes são biomarcadores do efeito da exposição aos estressores do meio ambiente.

Alguns autores sugerem que as alterações podem resultar em mau funcionamento dos vários sistemas orgânicos dos peixes (ORTIZ *et al.*, 2003). DESAI *et al.* (1984), relataram distúrbios nos cordões dos hepatócitos, ruptura da membrana celular e vacuolização plasmática no fígado de *Oreocarpus mossambicus*, após exposição a inseticidas organofosforados durante cinco dias.

As lesões encontradas no fígado dos animais amostrados neste trabalho podem ser devido ao fato de que o fígado é o órgão alvo da detoxificação dos agroquímicos usados. O contato a doses de MP neste tecido causou várias alterações celulares. Lesões similares também foram descritas em *R. quelen* expostos ao ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), clomazone e metil paration (CRESTANI *et al.*, 2007; CATTANEO *et al.*, 2008).

Durante o período de experimentação pode-se observar modificações no comportamento dos peixes amostrados, como nado errático, letargia e apatia (FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002). Miron *et al.* (2005) relataram alterações de comportamento em *R. quelen* quando expostos aos herbicidas clomazone, quinclorac e metasulfuron metil em concentrações próximas da CL₅₀.

6. CONCLUSÕES

O parationato metílico e o tebuconazole possuem elevado potencial de indução de estresse oxidativo em *Rhamdia quelen*, evidenciado pelo aumento significativo de TBARS, enquanto o glifosato não alterou a produção de TBARS no fígado dos jundiás. O conteúdo da proteína carbonil aumentou somente nos peixes expostos ao tebuconazole.

Jundiás expostos ao parationato metílico, ao tebuconazole e ao glifosato apresentaram uma significativa redução da atividade da enzima catalase, quando comparado ao grupo controle.

Jundiás expostos ao parationato metílico, ao tebuconazole e ao glifosato apresentaram um significativo aumento da atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST), quando comparado ao grupo controle.

Os jundiás expostos ao parationato metílico, ao tebuconazole e ao glifosato apresentaram maiores concentrações tanto de GSH quanto de ácido ascórbico quando comparados aos peixes controle, enquanto o conteúdo dos tióis não-protéicos aumentou somente em peixes expostos ao tebuconazole.

Peixes expostos ao parationato metílico e ao tebuconazole sofreram alterações histopatológicas no fígado como: degeneração difusa dos hepatócitos, estagnação biliar, hiperemia e vacúolos no citoplasma e núcleo;

Os peixes expostos ao parationato metílico e ao tebuconazole tiveram a atividade da AST aumentada, enquanto nenhum efeito foi verificado em relação a enzima ALT.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1523, p. 37-48. 2000.

ALMROTH, B. C.; STURVE, J.; STEPHENSEN, E.; HOLTH, T. F.; FÖRLIN, L. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. **Mar Environ. Res.**, v. 66, p. 271-277, 2008.

AL SZAREK, J. et al. Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marin. Environ. Res.**, v. 50, p.263-266, 2000.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceed of the National Academ of Scien of the USA.** v. 90, p. 7915-7922, 1993.

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

BALDISSEROTTO, B. Biologia do Jundiá. In: BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, j. **Criação do Jundiá.** Santa Maria: Ed, UFSM. p. 67-71. 2004.

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

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

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

BARCELLOS, L.J.G., WOEHL, V.M., WASSERMANN, G.F., KRIEGER, M.H., QUEVEDO, R.M., LULHIER, F. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture

and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquac. Res.** v. 32, p. 123–125. 2001b.

BARCELLOS, L.J.G. et al. Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. **Journ. of Fish Biol**, v.61, n.3, p.751- 763, 2002.

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

BARCELLOS, L.J.G. et al. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy Gaimard Pimelodidae) provoked by usual aquaculture practices, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquacul**, v.237, n.1-4, p.229-236. 2004b.

BARCELLOS, L.J.G., RITTER, F., KREUTZ, L.C., SILVA, L.B., CERICATO, L., QUEVEDO, R.M. The color of illumination affects stress response of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, Heptapteridae). **Ciênc. Rural** v. 36, p. 1249–1252. 2006b

BARREIROS, A.L. B. S; DAVID J.M.; DAVID J.P. – Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Societ Brasil de Química**, v. 29, p. 113-23. 2006.

BARLING, D. et al. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **Europ. J. Biochem**, v. 216, p. 579-86, 1993.

BAYER CROP SCIENCE LIMITED. **Environ. Inform. Sheet Folicurs MAPP** number11278.CPAGuidanceNotesversion3. &EIS. 2005.

BEYER, J. Fish biomarkers in marine pollution monitoring; evaluation and validation in laboratory and field studies. **Academic thesis, Univ of Bergen**, Norway. 1996.

BRAD J. KONWICK., ARTHUR W. GARRISON., JIMMY K. AVANTS., AARON T. FISK. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicol.** v. 80, p. 372–381. 2006.

CADENAS, E. e DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. **Free Rad. Biol. Med.** v. 29, p. 222-230. 2000.

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

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 sublethal concentrations of agrichemicals. **Comp. Biochem. Physiol. C** v. 148, p. 281–286. 2008.

CHOW, C. K. Vitamin-E and oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 11, p. 215-232. 1991.

COSTA, P.M., DINIZ, M.S., CAEIRO, S., LOBO, J., MARTINS, M., FERREIRA, A.M., CAETANO, M., VALE, C., DEL VALLS, T.A., COSTA, M.H., Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. **Aquat. Toxicol.** v.92, p. 202–212. 2009.

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

DANDAPAT, J., G. B. N. CHAINY & K. J. RAO. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comp. Biochem. Phys.** v. 127, p. 101–115. 2000.

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

DING, F; SONG, W.H; GUO, J; GAO, M.L; HU, W.X. Oxidative stress and structure activity relationship in the zebrafish (*Danio rerio*) under exposure to paclobutrazol. **J. Environ. Sci. Health, Part B** v. 44, p. 44-50. 2009.

DUDLER, R. et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 4, p. 14-18. 1991.

EL-SAYED, Y.S., SAAD, T.T., EL-BAHR, S.M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v. 24, p. 212– 217. 2007.

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

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

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

FINKEL T, HOLBROOK N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Natur.** v. 408, p. 239-247. 2000.

FLETCHER, L. M; KWOH-GAIN, I; POWELL, E. E; POWELL, L.W; HALLIDAY, J.W. Markers of chronic alcohol ingestion in patients with nonalcoholic steatohepatitis: an aid to diagnosis. **Hepatol.** v. 13, p. 455-9. 1991.

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

FRAGA, C.G. et al. Antioxidant defenses and mechanisms of protection against oxygen radicals. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiol and biochem of the fishes of the amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 323-330.

GAETANI, G.F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A.M.; KIRKMAN, H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, v.73, p. 334-339, 1989.

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

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

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

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

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

GOMES, M. A . F.; SPADOTTO, C. A . Impacto de defensivos agrícolas na qualidade da água. **XXV Congres Paulista de Fitopatol**. Anais, p.30. 2002.

GOMES, M.A.F.; SPADOTTO, C.A. Pesticidas e qualidade de água: estudo de caso do aquífero Guarani na região de Ribeirão Preto-SP. In: MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. Biodegradação. Jaguariúna: **Embrapa Meio Amb**. p.63-74. 2001.

GRAHAM, J. B. Ecological, evolutionary, and physical factors influencing aquatic animal respiration. **Am. Zool.**, v. 30, p. 137-146. 1990.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE. Free Radicals in Biology and Medicine, third ed.. **Oxford University Press**. 1999.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M .C. Free radicals in biology and medicine. New York, **Oxford University Press Inc.**, 3rd edition. 2000.

HALLIWELL, B; and GUTTERIDGE, J. M. C. Cellulra responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In (Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., eds.). Free radicals in Biology and Medicine, Oxford **University Press Inc**, p. 187-267. 2007.

HERNANDEZ, J; ROBLETO, NR; VELASCO, L.; QUINTERO, R.; PICKARD DHALT, R. Chloroperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides. **Pesticides Biochem and Fhisiol.** v. 61, pp. 87-94. 1998.

HENRIQUE, W. et al. Silagem de milho, sorgo, girassol e suas consorciações. II. Composição bromatológica, 1998. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998, Botucatu. **Socied Brasil de Zootec.** p.379–381. 1998.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symp**, n. 8, p. 51- 66. 1990.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: **Lewis Pubishers.** cap. 4, p. 155 –196. 1992.

<http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>. Acessado em 20 de julho de 2010. Acessado em 10 de outubro de 2010.

ÍNAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clinica Chimica Acta.** v. 305, p. 75– 80, 2001.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUATRACHUE, M. et al. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci. Asia**, v.28, p.121-127. 2002.

JORDÃO-JUNIOR, AFONSO, A., SILVEIRA, S., FIGUEIREDO, J. F. C. & VANNUCCHI, H. Urinary excretion and plasma vitamin E levels in patients with AIDS. **Nutrit.** v. 14, p. 423-426. 1998.

KASAPOGLU, M.; ÖZDEN, T. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. **Experim. Gerontology**. v. 36, p. 209-220, 2001.

KJAERSTAD, M.B., TAXVIG, C., NELLEMAN, C., VINGGAARD, A.M., ANDERSEN, H.R. Do azole fungicides possess an endocrine disrupting hazard? **Toxicol. Lett.** v. 180, p. 32–S246. 2008.

KONWICK, B. J; GARRISON, A.W; BLACK, M. C. Bioaccumulation, biotransformation and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout. **Environ Sci Technol.** v. 40, p. 2930-2936. 2006.

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

KRAMER, D. L. Dissolved oxygen and behavior. **Environ. Biol. Fish**, v. 18, p. 81-92. 1987.

KRETZSCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 48, p. 439-446. 1996.

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

LI, Mei-Hui. Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicol and Environ Safety**, v. 71. p. 781-786. 2008.

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

MALIK, J; BARRY, G; KISHORE, G. M. The herbicid glyphosate. **Biofact**. v. 2, p. 17-25. 1989.

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

MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**: 361-370. Merken, H.M. and Beecher, G.R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agric and Food Chem.** v. 48, p. 577-599. 2000.

MEISTER, A. and ANDERSON, M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* v. 52, p. 711-760. 1983.

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

MIRON, D.; PRETTO, A.; CESTANI, M.; GLUSCZAK, L.; SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M. Biochemical effects of clomazone herbicide on piavas (*Leporinus obtusidens*). **Chem**, 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*. **Chem**, v. 78, p. 294-299. 2010.

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

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

NORDBERG J, ARNER ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med** v. 31, p. 1287-1312. 2001

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

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

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

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

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

POLEKSIC, V.; KARAN, V. Effects of trifluralin on carp: Biochemical and Histological Evaluation. **Ecotox. Environ. Safe.**, San Diego, v. 43, p. 213-221. 1999.

RAMSDORF, Wanessa. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax* Sp B e A. *Altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda Cangüiri – UFPR). Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 127 f. 2007.

RELATÓRIO TÉCNICO - Folisuper 600 BR. AGRIPPEC – **Química e Farmacêutica S/A.** 1987.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de Herb**, 5ª ed. Londrina: IAPAR, 648p 2005.

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

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; RIZWANUL, H.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicol Environ Safety**, v. 56, p. 295-301. 2003.

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

SORBI, D; BOYNTON, J; LINDOR, K. D. The ratio aspartato aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. **J Gastroenterol**. v. 94, p. 1018-1022. 1999.

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

STADTMAN & LEVINE R. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci* v. 899, p. 191-208. 2000.

STEGEMAN, J.J., LECH, J.J. Cytochrome p-450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen pollutant exposure. **Environ Health Perspective**, v 90, p. 101-110. 1991.

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

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

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

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

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol Pharmacol**. v. 13, p. 57–149. 2003.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1205, p. 1-18. 1994.

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

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecol. Econ**. v.39 (3), p. 449-462. 2001.

YLÄ-HERTTUALA, S. Oxidized LDL and atherogenesis. **Heart in Stress Annals of The New York Acad of Scien**. v. 874, p. 134-137, 1999.

ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicol**, v. 129(1), p. 63-71. 1998.

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)