

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**EFEITOS DOS HERBICIDAS CLOMAZONE E AMETRINA EM
PARÂMETROS FUNCIONAIS DA ESPÉCIE DE PEIXE
NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***

LINDALVA PEREIRA

SÃO CARLOS – SP
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**EFEITOS DOS HERBICIDAS CLOMAZONE E AMETRINA EM
PARÂMETROS FUNCIONAIS DA ESPÉCIE DE PEIXE
NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***

LINDALVA PEREIRA

ORIENTADORA: Dra. MARISA NARCISO FERNANDES

CO-ORIENTADORA: Dra. CLÁUDIA BUENO DOS REIS MARTINEZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P436eh

Pereira, Lindalva.

Efeitos dos herbicidas clomazone e ametrina em parâmetros funcionais da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* / Lindalva Pereira. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
85 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Peixe. 2. Acetilcolinesterase. 3. Antioxidantes. 4. Biotransformação. 5. Hematologia. 6. Herbicidas. I. Título.

CDD: 597 (20^a)

Lindalva Pereira

**EFEITOS DOS HERBICIDAS CLOMAZONE E AMETRINA EM
PARÂMETROS FUNCIONAIS DA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL
*Prochilodus lineatus***

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 30 de março de 2012

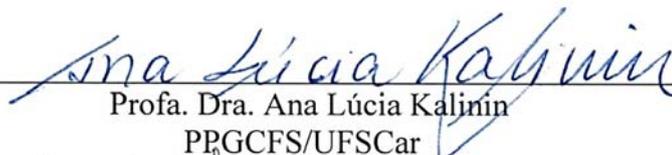
BANCA EXAMINADORA

Presidente



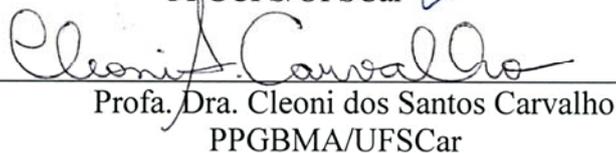
Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
(Orientadora)

1º Examinador



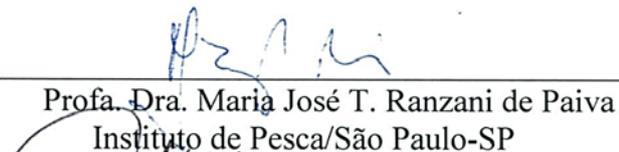
Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin
PPGCFS/UFSCar

2º Examinador



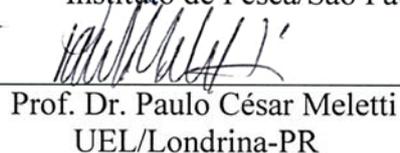
Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
PPGBMA/UFSCar

3º Examinador



Profa. Dra. Maria José T. Ranzani de Paiva
Instituto de Pesca/São Paulo-SP

4º Examinador



Prof. Dr. Paulo César Meletti
UEL/Londrina-PR

Dedicatória

*Aos meus filhos Lorena e Diego,
por me ajudarem a enfrentar o
meu maior desafio, ser mãe.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer sempre presente e me permitir traçar meu próprio destino.

À Dr^a Cláudia Bueno dos Reis Martinez toda minha admiração, respeito e gratidão pelos ensinamentos, orientação, apoio e amizade de sempre.

À Dr^a Marisa Narciso Fernandes, pela oportunidade dada e confiança depositada, e por todo apoio e compreensão.

À Dr^a Marta Marques de Souza, pela amizade e boas energias em todos os momentos.

À amiga de todas as horas Marina Mori Pires de Camargo, pela ajuda imprescindível, pelas horas de boa conversa e diversão e pelo ombro amigo nos momentos difíceis.

À amiga Cássia (Maria) Regina Bruno do Nascimento pelo apoio, companheirismo e maravilhosos momentos descontração.

Às amigas Andrea Martini Ribeiro e Juliana Delatim Simonato Rocha, por compartilharem comigo momentos importantes.

À Dalita Gomes Silva Morais Cavalcante, por todo ensinamento e ajuda no ensaio do cometa, e boas risadas ao longo desses anos de convívio.

À duas admiráveis e queridas mulheres, minha mãe e Sílvia Sofia, pela grande lição de superação.

À Sílvia Ponzoni por se preocupar comigo e me motivar sempre.

Aos companheiros do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) minha gratidão pelo espírito de equipe e pela grande contribuição neste trabalho.

À minha família, por compreender minha ausência e me apoiar incondicionalmente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar.

À Estação de Piscicultura da UEL pelo fornecimento dos peixes.

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

*E ainda que eu tivesse o dom da profecia
e conhecesse todos os mistérios e toda a
ciência, e tivesse toda a fé... e não tivesse
amor, nada seria.*

(I Coríntios 13:2)

PEREIRA, Lindalva. **EFEITOS DOS HERBICIDAS CLOMAZONE E AMETRINA EM PARÂMETROS FUNCIONAIS DA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL *Prochilodus lineatus***. 85 p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

RESUMO

O uso de biomarcadores é importante para avaliar os efeitos causados por agrotóxicos em organismos aquáticos como os peixes. No presente estudo foram utilizados os parâmetros hematológicos, metabólico (glicose plasmática), osmônicos (íons Na^+ , K^+ e Cl^-), bioquímico e genotóxico (ensaio do cometa), para avaliar a toxicidade dos herbicidas ametrina e clomazone para a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Peixes jovens foram expostos a três concentrações de clomazone: 1, 5 e 10 mg.L^{-1} , além do grupo controle (CTR) por 96 h. Este herbicida provocou alterações sanguíneas em *P. lineatus* como diminuição do hematócrito (Hcto) em 10 mg.L^{-1} ; hemoglobina (Hb), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em 5 e 10 mg.L^{-1} , que podem indicar anemia. O número de eritrócitos (RBC) apresentou aumento na menor concentração testada, refletindo provável resposta de estresse com liberação de eritrócitos jovens na corrente sanguínea. O clomazone também ativou as vias de desintoxicação e as vias antioxidantes dos animais testados, como foi demonstrado pelo aumento da atividade hepática da enzima de biotransformação glutationa-S-transferase (GST) e da enzima antioxidante catalase (CAT) em 5 e 10 mg.L^{-1} . A redução da atividade da glutationa peroxidase (GPx) observada em 5 e 10 mg.L^{-1} indica atuação eficiente da CAT na remoção do H_2O_2 , ou competição com a GST pelo substrato glutationa reduzida (GSH). A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) cerebral de *P. lineatus* foi inibida nas concentrações de 5 e 10 mg.L^{-1} de clomazone, mostrando que este produto tem ação anticolinesterásica para a espécie em questão. O herbicida ametrina foi testado de duas formas: utilizado na sua forma pura e também como produto formulado Gesapax[®]500, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L^{-1} . Os peixes expostos a estes produtos durante 96 h apresentaram alterações hematológicas como diminuição do Hcto em 2,5 e 5,0 mg.L^{-1} e do RBC na concentração de 5,0 mg.L^{-1} . O aumento do K^+ plasmático na concentração de 2,5 mg.L^{-1} , juntamente com as alterações hematológicas podem ser indicativos de rompimento dos eritrócitos. Os peixes expostos tanto à ametrina pura quanto ao produto formulado, apresentaram aumento da glicemia como resposta de estresse em ambas as concentrações testadas. A ametrina pura e o Gesapax[®]500 causaram inibição da atividade branquial da Na^+/K^+ ATPase em 5,0 mg.L^{-1} . Foi verificada diminuição significativa de malondialdeído (MDA) nos peixes expostos à concentração de 5 mg.L^{-1} de ametrina e de Gesapax[®]500, indicando que estes não

geraram peroxidação lipídica. Danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus* foram observados na concentração de 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e Gesapax®500, evidenciando a genotoxicidade destes, provavelmente por ação direta sobre material genético. Os resultados obtidos permitem concluir que os herbicidas ametrina e clomazone interferem nos parâmetros funcionais de *P. lineatus*, podendo comprometer a saúde desses animais.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, antioxidantes, biotransformação, danos no DNA, hematologia, herbicidas.

PEREIRA, Lindalva. **EFFECTS OF THE HERBICIDES CLOMAZONE AND AMETRYN ON FUNCTIONAL PARAMETERS OF THE NEOTROPICAL SPECIES OF FISH *Prochilodus lineatus*** 85 p. PhD Thesis (Pos-Graduate Program in Ecology and Natural Resources) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

ABSTRACT

The use of biomarkers can provide a great help in the evaluation of the damages caused by pesticides in aquatic organisms. The present study aimed to verify the toxicity of clomazone and ametryn for a tropical freshwater fish *Prochilodus lineatus* by using different parameters in fish exposed for 96h to clomazone (1, 5 and 10 mg.L⁻¹) and to ametryn, as the commercial product Gesapax[®]500 or in its pure form, in the concentrations 2.5 and 5.0 mg.L⁻¹, or only to water (CTR). The parameters used were: hematological; metabolic (concentration of glucose); osmoionic (osmolarity and plasmatic Cl⁻, Na⁺ e K⁺); biochemical and genotoxic (DNA damage). Clomazone caused hematological disturbances in *P. lineatus* as noted in the lower values of hematocrit (Hct) in 10 mg.L⁻¹; hemoglobin (Hb), mean corpuscular hemoglobin (HCM) and mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM) in 5 and 10 mg.L⁻¹, which, in general, may indicate anemia. The number of erythrocytes (RBC) presented increased values in the lower concentration tested for clomazone, which probable is related to the stress response, with the releasing of immature erythrocytes in the blood stream. Clomazone also activated the detoxification and antioxidant pathways of the tested animals, as shown by the increased activity of the hepatic biotransformation enzyme glutathione-S-transferase (GST) and the antioxidant enzyme catalase (CAT) in 5 and 10 mg.L⁻¹. The reduced activity of glutathione peroxidase (GPx) observed in 5 and 10 mg.L⁻¹ indicated efficient performance of CAT removing the H₂O₂, or even a competition with GST for the substrate reduced glutathione (GSH). The activity of brain acetylcholinesterase (AChE) in *P. lineatus* was inhibited in the concentrations of 5 and 10 mg.L⁻¹ of clomazone, showing that this herbicide has an anticholinesterasic effect on the studied fish species. Fish exposed to ametryn showed hematological disturbances such as lower values of Hct in 2.5 and 5.0 mg.L⁻¹ and of RBC in the concentration of 5.0 mg.L⁻¹. The reduction of plasmatic K⁺ in the concentration of 2.5 mg.L⁻¹, and the hematological alterations mentioned above, may indicate a rupture of the erythrocytes. Fish exposed both to pure ametryn and the formulated product, showed higher values of glucose as a stress response, in both concentrations tested. The two products also caused inhibition of the gill activity of Na⁺/K⁺ATPase in 5.0 mg.L⁻¹. The concentration of 5.0 mg.L⁻¹ caused significant decrease in the malondialdehyde (MDA) levels, leading to the conclusion that ametryn or its formulated product do not generate lipidic peroxidation. DNA damages in the erythrocytes of *P. lineatus* were

observed in the concentration of 5.0 mg.L^{-1} of ametryn and Gesapax[®] 500, showing the genotoxicity of ametryn, probably because it binds directly to the genetic material of the fish. The results presented here allow concluding that the pesticides ametryn and clomazone interfere in the functional parameters of *P. lineatus* and can compromise the health of these animals.

Key-words: acetylcholinesterase, antioxidants, biotransformation, DNA damages, pesticides, hematology, fish.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Valores médios e desvio padrão (n = 10-12) do hematócrito (A), concentração de hemoglobina (B), número de eritrócitos (C), volume corpuscular médio (D), hemoglobina corpuscular média (E) e concentração de hemoglobina corpuscular média (F) de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações (1, 5 e 10 mg.L⁻¹) de clomazone ou somente a água (0) por 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05).27
- Figura 2. Valores médios e desvio padrão (n = 10-12) da atividade hepática da glutathione-S-transferase (A), catalase (B) e glutathione peroxidase (C) de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações (1, 5, e 10 mg.L⁻¹) de clomazone ou somente a água (0), por 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa (P< 0,05).28
- Figura 3. Valores médios e desvio padrão (n = 10-12) da acetilcolinesterase cerebral de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações (1, 5, e 10 mg.L⁻¹) de clomazone ou somente a água (0), por 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa (P< 0,05).29
- Figura 4. Valores médios e desvio padrão (n = 8) do hematócrito (A), hemoglobina (B) e número de eritrócitos (C) de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P< 0,05).50
- Figura 5. Valores médios e desvio padrão (n = 8) da concentração de glicose plasmática de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P< 0,05).51
- Figura 6. Valores médios e desvio padrão (n = 8) das concentrações plasmáticas de sódio (A), cloreto (B), potássio (C) e osmolaridade (D) de *P. Lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P< 0,05).52
- Figura 7. Valores médios e desvio padrão (n = 8) da atividade da enzima Na⁺/K⁺ATPase (A) e anidrase carbônica (B) em brânquias de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P< 0,05).53
- Figura 8. Valores médios e desvio padrão (n = 8) da atividade das enzimas etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) (A), GST (B), SOD (C), CAT (D), GPx (E) e conteúdo de GSH (F), em fígado de *P. lineatus* expostos por 96 h às

concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P < 0,05).....54

Figura 9. Valores médios e desvio padrão (n = 8) do conteúdo de MDA em fígado de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P < 0,05).....55

Figura 10. Valores médios e desvio padrão (n = 8) da atividade da AChE de cérebro (A) e músculo (B) de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P < 0,05).56

Figura 11. Escore médio (n = 8) de danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P < 0,05).....57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	18
3. PARTE I – ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NO PEIXE PROCHILODUS LINEATUS PROVOCADAS PELO HERBICIDA CLOMAZONE... 19	19
RESUMO	19
3. 1. INTRODUÇÃO	20
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.2.1. Organismos Teste	23
3.2.2. Testes de Toxicidade	23
3.2.3. Amostragem	24
3.2.4. Análises Hematológicas	24
3.2.5. Análises Bioquímicas	25
3.2.6. Análise Estatística	26
3.3. RESULTADOS.....	26
3.3.1. Parâmetros Hematológicos	26
3.3.2. Parâmetros Bioquímicos	26
3.4. DISCUSSÃO	29
3.5. REFERÊNCIAS.....	33
4. PARTE II - ALTERAÇÕES EM PARÂMETROS FUNCIONAIS DO PEIXE PROCHILODUS LINEATUS INDUZIDAS PELO PRINCÍPIO ATIVO AMETRINA E PELO SEU PRODUTO GESAPAX® 500	38
RESUMO	38
4.1. INTRODUÇÃO	39
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.2.1. Organismos Teste	44
4.2.2. Testes de Toxicidade	44
4.2.3. Amostragem	45
4.2.4. Análises Hematológicas	45
4.2.5. Análise da Glicemia.....	46
4.2.6. Análises Plasmáticas da Osmolaridade e Concentrações Iônicas (Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻).....	46
4.2.7. Atividade Branquial das Enzimas Na ⁺ /K ⁺ ATPase (NKA) e Anidrase Carbônica (AC).....	46
4.2.8. Enzimas de Biotransformação e Antioxidantes no Fígado	47
4.2.9. Peroxidação Lipídica no Fígado	48
4.2.10. Acetilcolinesterase em Cérebro e Músculo	48
4.2.11. Concentração de Proteínas.....	48
4.2.12. Análise de Danos Genotóxicos no DNA – Ensaio do Cometa.....	48

4.2.13. Análises Estatísticas.....	49
4.3. RESULTADOS.....	50
4.3.1. Parâmetros Hematológicos	50
4.3.2. Parâmetro Metabólico	51
4.3.3. Parâmetros Osmo-iônicos	51
4.3.4. Parâmetros Bioquímicos	52
4.3.4.1. Atividade branquial das enzimas Na ⁺ /K ⁺ ATPase e anidrase carbônica	52
4.3.4.2. Atividade hepática das enzimas de biotransformação e defesas antioxidantes	53
4.3.4.3. Peroxidação lipídica	54
4.3.4.4. Atividade da acetilcolinesterase	55
4.3.5. Parâmetro Genético	56
4.3.5.1. Danos no DNA – ensaio do cometa	56
4.4. DISCUSSÃO	57
4.5. REFERÊNCIAS.....	62
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
6. REFERÊNCIAS GERAIS	72

1. INTRODUÇÃO GERAL

O meio ambiente tem recebido inúmeros poluentes orgânicos e inorgânicos provenientes de atividades humanas (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Neste contexto, a contaminação das águas vem tomando proporções alarmantes nos últimos tempos, já que muitos dos produtos químicos liberados no ambiente atingem os sistemas aquáticos e os organismos que aí vivem, podendo provocar diferentes efeitos tóxicos (STEGEMAN *et al.*, 1992; ERICKSON *et al.*, 2008). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), a contaminação de rios por efluentes domésticos, industriais e resíduos sólidos, tem gerado escassez de disponibilidade de água de qualidade mesmo em áreas com recursos hídricos abundantes, além de aumentar os custos no tratamento de água para o abastecimento. Dados sobre a qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo (relatório CETESB, 2010) mostram que a presença de contaminantes nos ambientes aquáticos foi a causa predominante de mortalidade de peixes nos anos de 2006, 2008, 2009 e 2010.

Além das águas superficiais, a contaminação atinge também as águas subterrâneas. A presença de contaminantes nos lençóis freáticos é preocupante, pois é difícil estabelecer uma política pública para sua mitigação e/ou remoção devido aos custos elevados das intervenções para a recuperação desses locais (WILLETT & WILLETT, 2008). Atualmente buscam-se formas de identificar as fontes contaminantes das águas subterrâneas com o intuito de diminuir os riscos à saúde e os custos com o processo de recuperação dos ecossistemas aquáticos (MAO, 2011).

A expansão agrícola das últimas décadas levou ao aumento da utilização de produtos tóxicos que visam garantir a produtividade. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2010), em 2008 o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo os herbicidas os mais utilizados. No Brasil, o total de herbicida comercializado em 2009 superou 127 mil toneladas (IBAMA, 2010), e continuou a ser a principal classe comercializada em 2010 e 2011 (SINDAG, 2011).

A toxicidade dos agrotóxicos pode não ficar restrita apenas aos locais onde são aplicados (DENEER, 2000). Estes podem ser introduzidos nos ambientes aquáticos durante sua aplicação por pulverização aérea, pelo escoamento superficial das águas da chuva proveniente da agricultura e por infiltração, atingindo os lençóis freáticos. A entrada de agrotóxicos nos ambientes aquáticos também pode ocorrer de forma acidental durante a sua manufatura, ou, propositalmente para combater plantas invasoras, algas e vetores de doenças (RAND, 1995).

Os dados com relação à contaminação das águas por agrotóxicos são preocupantes. Segundo o U S Geological Survey (USGS, 2010), cerca de 1 milhão de toneladas de agrotóxicos são usados a cada ano nos Estados Unidos, e inseticidas organoclorados como o DDT ainda são detectados em muitos corpos d'água mais de 20 anos após a sua utilização na agricultura ter sido proibida. Na Martinica, no Caribe, foi detectada a presença de pesticidas organofosforados em organismos aquáticos como peixes, plancton e moluscos, em área produtora de banana (COAT *et al.*, 2006). Em áreas agrícolas na China, a contaminação por pesticidas organoclorados tem sido detectada no sedimento, no zooplâncton e nos peixes (LI *et al.*, 2008), sendo que nestes últimos foram encontrados valores acima daqueles atualmente estabelecidos pela EPA (2009). Muitos dos organoclorados encontrados, como o hexaclorociclohexano (HCH), heptaclor, aldrin, DDD e DDT são pesticidas altamente persistentes no ambiente (TANG *et al.*, 2008).

No Brasil, ambientes aquáticos de áreas agrícolas mostram altos índices de contaminação por defensivos agrícolas. Análises da água de áreas agrícolas próximas à cidade de Primavera do Leste (MT) mostraram a presença de agrotóxicos como inseticidas, fungicidas e herbicidas, sendo que estes últimos foram detectados em 73% das amostras de água da região, alguns de elevada persistência no ambiente aquático como a atrazina (DORES & DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; DORES *et al.*, 2008). Sistemas hídricos contaminados por agrotóxicos foram detectados em região produtora de cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí (SP) (ARMAS & MONTEIRO, 2005), no município de Paty dos Alferes (RJ) (VEIGA *et al.*, 2006) e na região agrícola de Agudo (RS) (BORTOLUZZI *et al.*, 2006).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992), os agrotóxicos são classificados quanto à sua toxicidade em: Classe I - Produtos Extremamente Tóxicos; Classe II - Produtos Altamente Tóxicos; Classe III - Produtos Medianamente Tóxicos; Classe IV - Produtos Pouco Tóxicos. Os herbicidas mais comercializados no Brasil em 2009 pertencem a Classe III, totalizando 52% de todo herbicida utilizado (IBAMA, 2010).

Entre os herbicidas mais utilizados nas lavouras no controle pré e pós-emergente de plantas infestantes está o clomazone (2-[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona), que pertence ao grupo químico isoxazolidinona e age como inibidor da síntese de carotenóides. Esses pigmentos estão envolvidos no processo de fotossíntese, pela proteção contra a foto-oxidação (Duke, 1990). O clomazone é um herbicida muito usado para grandes culturas como algodão, tabaco, soja, arroz, cana-de-açúcar e uma variedade de hortaliças, sendo classificado como moderadamente tóxico (Classe III) (EPA, 2007). Em 2009, este herbicida ficou entre os dez herbicidas mais utilizados no Brasil (IBAMA, 2010).

O cultivo da cana de açúcar vem crescendo nos últimos anos, principalmente no Estado de São Paulo que é o seu maior produtor, seguido de Minas Gerais, Goiás, Paraná, Mato Grosso do Sul, Alagoas e Pernambuco (CONAB, 2011). O arroz também está entre as culturas de maior produção no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor brasileiro de arroz irrigado (Ministério da Agricultura, 2011), onde o clomazone é muito utilizado. Nessas culturas, o uso recomendado para o produto formulado à base de clomazone o Gamit[®] 500 EC varia de 0,8 a 3,0 L.ha⁻¹ (RODRIGUES & ALMEIDA, 2011). Considerando-se que cada litro do produto formulado contém 500 mg do princípio ativo, as concentrações de clomazone recomendadas para uso variam entre 0,4 a 1,5 g.ha⁻¹.

Estudos já comprovaram a presença do herbicida clomazone nas águas localizadas em áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (ARMAS & MONTEIRO, 2005), de arroz no Rio Grande do Sul (PRIMEL, 2005) e nas águas superficiais de região agrícola em Agudo, RS (BORTOLUZZI *et al.*, 2006). Concentrações de 3,4 µg.L⁻¹ a 4,7 µg.L⁻¹ de clomazone foram encontradas nas águas de cultivo de arroz irrigado no Rio Grande do Sul (MARCHESAN *et al.*, 2010). Este herbicida tem se mostrado tóxico para espécies de peixes neotropicais como

Rhamdia quelen (Pimelodidae) e *Leporinus obtusidens* (Anostomidae) (MIRON *et al.*, 2005; CRESTANI *et al.*, 2006; CRESTANI *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2007; MIRON *et al.*, 2008). Em *R. quelen* a CL₅₀ 96 h foi de 7,32 mg.L⁻¹ de clomazone (MIRON *et al.*, 2004).

A alta solubilidade do clomazone na água que é de 1.100 mg.L⁻¹ (EPA, 2007), aumenta seu potencial de contaminação das águas superficiais e, provavelmente, das águas subterrâneas (PRIMEL, 2005; QUAYLE *et al.*, 2006). De acordo com o Departamento de Regulação de Pesticidas da Califórnia (CDPR, 2003), o clomazone é degradado mais rapidamente em condições anaeróbias. A degradação deste herbicida ocorre mais rapidamente em pH mais ácido do que em pH neutro e alcalino (ZANELLA *et al.*, 2008). Quando dissolvido em água, o clomazone não é facilmente degradado na presença de luz (CDPR, 2003). Esses dados são importantes para a compreensão do comportamento do agrotóxico no ambiente. Noldin *et al.* (2001), detectaram clomazone na água por até 32 dias após aplicação e Santos *et al.* (2008), detectaram o clomazone em lâmina d'água de arroz irrigado até 13 dias após a área ter sido inundada, que ocorreu 26 dias após a aplicação do produto. Zanella *et al.* (2008) também detectaram resíduos do produto (7,8 µg L⁻¹) em campos de arroz irrigado, cerca de quatro semanas após a aplicação.

Os herbicidas triazínicos também estão entre os agrotóxicos muito utilizados na agricultura, sendo a atrazina o mais conhecido deles. Porém, outro triazínico que vem se destacando pelo uso é a ametrina, que se encontra entre os dez herbicidas mais utilizados no Brasil em 2009 (IBAMA, 2010). O herbicida ametrina (2-etilamino)-4-(isopropilamino)-6-(metiltio)-s-triazina é inibidor da fotossíntese e atua ligando-se a proteína plastoquinona (Q_B) da cadeia de elétrons do fotossistema II, inibindo o transporte de elétrons (DUKE, 1990). Este herbicida apresenta classificação toxicológica III, sendo considerado moderadamente tóxico (EPA, 2005).

No período de 2000 a 2004, a ametrina esteve entre os herbicidas mais utilizados em região produtora de cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí (SP), chegando a ocupar a segunda posição em 2003, depois do glifosato (ARMAS & MONTEIRO, 2005). Este herbicida também está entre os agrotóxicos encontrados

nas águas da ilha de Martinica, uma região produtora de bananas (BOCQUENÉ & FRANCO, 2005). A presença de ametrina ($0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$) já foi detectada em amostras de água no Rio Mogi-Guaçu e no baixo Rio Pardo SP (JACOMINI *et al.*, 2011). As aplicações nas lavouras ocorrem através do uso de formulações comerciais como o Gesapax[®] 500, em quantidades que variam de 5 a 8 L.ha^{-1} (RODRIGUES & ALMEIDA, 2011), que corresponde a 2,5 a 4 g de ametrina por ha. A ametrina possui solubilidade relativamente baixa em água que é de 200 mg.L^{-1} (RODRIGUES & ALMEIDA, 2011), e pesticidas com moderada a baixa solubilidade em água têm potencial para se acumular nos sedimentos e na biota aquática (USGS, 2010).

Testes de toxicidade com o herbicida ametrina mostraram que os metabólitos formados a partir da sua degradação foram tóxicos para a bactéria *Vibrio fischeri*, sendo esta toxicidade determinada pela diminuição da bioluminescência apresentada pela bactéria (FARRÉ *et al.*, 2002). A ametrina é considerada ligeira ou moderadamente tóxica para peixes e invertebrados de água doce (EPA, 2005). Em estudos de toxicidade aguda com peixes de regiões temperadas o produto foi considerado de moderada toxicidade para *Cyprinodon variegatus* (CL_{50} 96h: $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$) e de baixa toxicidade para *Oncorhynchus mykiss* (CL_{50} 96h: 16 mg.L^{-1}) (EPA, 2005). Em exposições crônicas foi verificado que o herbicida ametrina afetou o crescimento de peixes de água doce (*Pimephales promelas*) e a reprodução de crustáceo (*Daphnia*) em concentrações de $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,24 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente (EPA, 2005). A toxicidade aguda da ametrina para o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* foi de $27,81$ (CL_{50} 24h) e $7,54 \text{ mg.L}^{-1}$ (CL_{50} 96h) (LOMBARDI *et al.*, 2001).

A preocupação com a presença de substâncias tóxicas na água tem levado ao desenvolvimento de técnicas que possam ajudar na remoção dessas substâncias do ambiente. Estudos tecnológicos alternativos sobre degradação de moléculas como a ametrina estão sendo desenvolvidos para o tratamento eficaz de águas poluídas por herbicidas (DUARTE *et al.*, 2009). Por ser resistente a hidrólise (meia-vida 368 dias), a principal via de degradação da ametrina é pelo metabolismo aeróbico no solo, com meia-vida entre 9 a 38 dias onde forma metabólitos como 2-amino-4-isopropilamino-6-metiltio-s-triazina e 2-etilamino-4-amino-6-metiltio-s-triazina. Estes também são considerados tóxicos e podem atingir as águas por

escoamento superficial ou por infiltração (EPA, 2005). A degradação da ametrina por cloração indicou que o pH influencia nesse processo, pois esta ocorre mais rapidamente em água com pH mais ácido e neutro do que em alcalino (XU *et al.*, 2009). A decomposição da ametrina por radiação ultravioleta foi maior na presença de peróxido de hidrogênio, justificada pela maior formação de radical hidroxil, e a eficiência do método pode ser aumentada com a remoção do íon cloreto da água, uma vez que este íon alcaliniza o meio (GAO *et al.*, 2009).

Embora não esteja estabelecido níveis de concentrações toleráveis específicos para a ametrina no ambiente aquático, a Resolução CONAMA 357 (2005) que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, atribui valor máximo de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ para compostos triazínicos como atrazina e a simazina, para as águas de classe I destinadas ao consumo humano e proteção das comunidades aquáticas. Esta mesma resolução determina também que quando apropriado, a qualidade dos ambientes aquáticos pode ser avaliada por indicadores biológicos utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas.

Entre os organismos aquáticos, os peixes têm ocupado uma importante posição no campo da toxicologia (Di Giulio e Hinton, 2008). A espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (Characiforme) é nativa dos rios da América do Sul, sendo uma das espécies mais abundantes (SIVASUNDAR *et al.*, 2001). Este peixe é conhecido popularmente como curimba e vem se destacando comercialmente no sul do Brasil pelo seu potencial para a pesca, e devido a sua alta produtividade e fácil cultivo em pisciculturas (WINKALER *et al.*, 2007). O curimba tem grande importância na alimentação humana pelo seu valor nutritivo, pois apresenta baixo teor de gordura e alto teor de proteína (MACHADO & FORESTI, 2009). Além de ser utilizado na alimentação humana, suas larvas servem de alimento vivo para outras espécies de peixe (VIVEIROS *et al.*; 2010). Essa espécie também cumpre importante papel funcional em ecossistemas de regiões neotropicais pela ingestão e processamento de grande quantidade de sedimento (STASSEN *et al.*, 2010).

Os peixes detritívoros possuem especializações do trato digestório que facilitam a tomada e separação das partículas, assim como a absorção dos

nutrientes (SPERANZA & COLOMBO, 2009). O *P. lineatus* é um representante desse grupo e alimenta-se de sedimento e algas (MORAES *et al.*, 1997; SPERANZA & COLOMBO, 2009), podendo assimilar contaminantes presentes no sedimento pela via digestiva. Sabe-se que *P. lineatus* é uma espécie migratória de longas distâncias, podendo nadar centenas de quilômetros até sua área de desova (SIVASUNDAR *et al.*, 2001; SHIBATTA *et al.*, 2007), portanto, pode expor-se a diferentes ambientes contaminados. Essa espécie está presente em rios importantes da Região Sudeste e Sul do Brasil como o Rio Mogi Guaçu (SP) e Rios Tibagi e Paraná (PR) (MACHADO & FORESTI, 2009; MAKRAKIS *et al.*, 2007; SHIBATTA *et al.*, 2007; GUBIANI *et al.*, 2007). Por esses motivos esta espécie tem sido muito utilizada para avaliar a qualidade de ambientes impactados (ALMEIDA *et al.*, 2005; CAMARGO & MARTINEZ, 2006; CAZENAVE *et al.*, 2009) e em testes de toxicidade com diferentes contaminantes como metais, agrotóxicos e derivados de petróleo (CARVALHO & FERNANDES, 2008; PEREIRA MADUENHO & MARTINEZ, 2008; SIMONATO *et al.*, 2008; CAMARGO *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010 a, b; PAULINO *et al.*, 2012). Devido a sua importância econômica (CAZENAVE *et al.*, 2009) e por ser uma espécie neotropical considerada vulnerável a alterações ambientais (STASSEM *et al.*, 2010), esta espécie tem potencial para ser usado em programas de monitoramento de áreas contaminadas.

A toxicologia aquática contribui na determinação da quantidade máxima de agentes tóxicos que podem ser tolerados no ambiente, sem que estes causem danos significativos à biota residente e estuda os efeitos qualitativos e quantitativos dos contaminantes nos organismos aquáticos. Os trabalhos sobre os efeitos de agentes tóxicos sobre os organismos aquáticos permitem estabelecer limites de concentração de substâncias tóxicas aceitáveis no ambiente, sem causar danos significativos à biota residente, sendo indispensáveis para se conhecer riscos e apresentar recomendações quanto ao uso de pesticidas (RAND & PETROCELLI, 1985; RAND, 1995). No ambiente aquático, as substâncias químicas podem sofrer transformações como hidrólise, oxidação e fotólise, ou ainda pode ocorrer biotransformação pelos organismos que ali habitam. Os efeitos dos contaminantes nos peixes e em outros organismos aquáticos podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, como molecular, bioquímico, genético e morfológico, podendo provocar alterações estruturais e funcionais consideradas de baixa

relevância ecológica (ADAMS *et al.*, 1990; HEATH, 1995). Quando os contaminantes interferem no crescimento e na reprodução dos animais podem por em risco a sobrevivência da população local, afetando assim a comunidade e o ecossistema como um todo, sendo, portanto, de alta relevância ecológica (RAND, 1995; VAN DER OOST *et al.*, 2003; DI GIULIO & HINTON, 2008).

Para avaliar se a presença de determinado contaminante na água causa efeitos adversos nos organismos, pode-se utilizar testes de toxicidade padronizados (HEATH, 1995; RAND, 1995). A exposição aguda às substâncias tóxicas estimula respostas rápidas ou adaptativas do animal. Os testes de toxicidade são capazes de detectar essas alterações, cujos resultados podem servir de subsídios para utilização de métodos e técnicas que ajudem a prevenir a ocorrência de alterações de alta relevância ecológica em que as populações e as comunidades são severamente afetadas (WENDELAAR BONGA, 1997). Para isso, as técnicas que evidenciam respostas em níveis mais baixos de organização biológica são as mais eficazes e se baseiam na análise de biomarcadores, que vem se destacando como uma das abordagens mais promissoras na ecotoxicologia (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Os biomarcadores são alterações biológicas decorrentes de exposição a contaminantes e que são passíveis de serem mensuradas. Estes podem ser utilizados como indicadores de exposição e/ou efeitos de poluentes ambientais e permitem avaliar a saúde do organismo, além de alertar sobre possíveis riscos ambientais (MAYER *et al.*, 1992; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Entre os principais biomarcadores utilizados atualmente estão os parâmetros hematológicos, metabólicos, osmo-iônicos, bioquímicos, genéticos, entre outros.

Na presença de substâncias tóxicas o organismo reage desencadeando uma série de reações conhecidas como resposta de estresse (BARCELLOS *et al.*, 2003). Inicialmente, um estímulo do sistema nervoso central desencadeia a liberação imediata de hormônios como as catecolaminas adrenalina e noradrenalina e o cortisol. A liberação desses hormônios é considerada resposta primária do organismo frente ao agente estressor e desencadeia uma série de reações denominadas respostas secundárias de estresse, como por exemplo, as

alterações hematológicas, metabólicas e osmo-iônicas (WENDELAAR BONGA, 1997; IWAMA *et al.*, 2006).

Os parâmetros hematológicos são importantes na avaliação da saúde de muitos organismos incluindo os peixes (DE PEDRO *et al.*, 2005). O sangue é responsável pela homeostase do corpo, pois desempenha importantes funções no organismo como o transporte de gases, nutrientes, hormônios, metabólitos entre outros. A adaptabilidade das funções dos eritrócitos é importante para a sobrevivência dos peixes teleósteos, e distúrbios dessas funções podem ser componentes importantes para o estudo dos efeitos dos contaminantes ambientais (NIKINMAA, 1992). Os agentes tóxicos e os distúrbios ambientais podem afetar a produção, função e até mesmo a sobrevivência dos eritrócitos de peixes (BLOOM & BRANDIT, 2008), refletindo no aumento ou decréscimo dos parâmetros hematológicos como o hematócrito (MARTINEZ & CÓLUS, 2002). As alterações osmorregulatórias também podem causar hemoconcentração ou hemodiluição devido à perda ou ganho de água (HEATH, 1995; MARTINEZ & CÓLUS, 2002). A anemia, caracterizada pela redução do número de células vermelhas circulantes e consequente redução na concentração de hemoglobina, é outra disfunção que também pode ocorrer devido à exposição aos xenobióticos, podendo ser resultante do decréscimo na produção de eritrócitos ou do aumento da destruição destes. Alterações no volume corpuscular médio (VCM) ou hemoglobina corpuscular média (HCM), são também distúrbios hematológicos que costumam ocorrer após exposição à agentes estressores (EVANS, 2008). Estudos mostram que alguns agrotóxicos interferem nos parâmetros sanguíneos de peixes, como o glifosato (GLUSCZAK *et al.*, 2006), o organofosforado diazinon (KÖPRÜCÜ *et al.*, 2006), o piretróide cipermetrina (PARMA *et al.*, 2007) e o diflubenzuron (PEREIRA MADUENHO & MARTINEZ, 2008). Embora não sejam respostas específicas, os parâmetros hematológicos podem ser considerados bons biomarcadores, por serem sensíveis a contaminantes (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Entre as muitas funções dos hormônios de estresse, está a disponibilização de glicose a partir dos estoques de carboidratos do fígado pelo processo de glicogenólise, ou indução de gliconeogênese para atender a demanda energética envolvida no mecanismo de adaptação do animal exposto ao agente

estressor (IWAMA *et al.*, 2006; VAL *et al.*, 2004; WENDELAAR BONGA, 1997). Mudanças no metabolismo de carboidratos podem ser utilizadas como indicadores de estresse em peixes, uma vez que a hiperglicemia reflete a mobilização da energia necessária para o restabelecimento da homeostase (HEATH, 1995; WENDELAAR BONGA, 1997; RAMESH *et al.* 2009) e o decréscimo da glicose plasmática indica esgotamento das reservas energéticas, necessárias para a sobrevivência do animal (WENDELAAR BONGA, 1997). Peixes expostos a agrotóxicos apresentaram quadro de hiperglicemia como resposta de estresse, como observado em *R. quelen* expostos a 0,5 e 10 mg.L⁻¹ de clomazone por 12, 24, 48, 96 e 192 h (CRESTANI *et al.*, 2006); em *L. obtusidens* expostos a 3, 6, 10 e 20 mg.L⁻¹ de glifosato por 96 h (GLUSCZAK *et al.*, 2006) e em *P. lineatus* expostos a 25 mg.L⁻¹ de diflubenzuron por 96 h (PEREIRA MADUENHO & MARTINEZ, 2008).

Alterações nas concentrações iônicas e na osmolaridade do organismo também podem ocorrer como respostas de estresse. Concentrações de íons como o Na⁺, K⁺ e Cl⁻ podem ser parâmetros indicativos de alterações no processo de hiperregulação em peixes de água doce, quando em contato com contaminantes (HEATH, 1995; WANG & YIN, 1997). Além de resposta do organismo à presença do agente estressor, essas alterações podem ser devido à interferência do contaminante em órgãos envolvidos no balanço hidromineral como as brânquias (WENDELAAR BONGA, 1997). Este órgão desempenha diferentes funções no peixe, pois além das trocas gasosas, atua no equilíbrio ácido-básico, na eliminação de excretas nitrogenadas e na osmorregulação (WENDELAAR BONGA, 1997; MARTINEZ & CÓLUS, 2002; FERNANDES & MAZON, 2003). O epitélio branquial é a interface entre o organismo e o ambiente. Portanto, existe uma íntima relação entre o sangue que passa pelas lamelas branquiais e a água, que se reflete na tomada de íons e conseqüentemente no balanço hídrico (WENDELLAR BONGA, 1997; DE LA TORRE *et al.*, 2007).

Os teleósteos dulcícolas apresentam concentração osmótica de seus fluidos internos mais elevada que o meio onde vivem, fazendo com que ganhem água do meio externo mais diluído e percam sais para o mesmo. Para compensar esse influxo constante de água e as perdas iônicas por difusão, esses peixes produzem grande quantidade de urina diluída e fazem absorção ativa de íons

pelas brânquias, que contem grande quantidade de células-cloreto (WENDELAAR BONGA, 1997; HIROSE *et al.*, 2003). Estas células, também conhecidas como células ricas em mitocôndrias, em função da sua intensa atividade metabólica, são as principais células transportadoras de íons nestes peixes (WENDELAAR BONGA, 1997; HIROSE *et al.*, 2003; HWANG & LEE, 2007). As células-cloreto possuem na membrana basolateral, um conjunto de proteínas especializadas em transporte de íons, geralmente chamadas de ATPases. Estas enzimas desempenham papel fundamental no balanço iônico e na osmorregulação (HIROSE *et al.*, 2003; HWANG & LEE, 2007). Nas brânquias dos peixes de água doce, a Na^+/K^+ ATPase (NKA) é uma dessas importantes ATPases na tomada de íons. A NKA cria um gradiente eletroquímico para a absorção de Na^+ e Cl^- , que são então trocados por H^+ e HCO_3^- , produtos resultantes da hidratação do CO_2 no meio intracelular devido à ação da enzima anidrase carbônica (AC). Além da manutenção das concentrações intracelulares dos íons Na^+ e K^+ , a NKA libera energia necessária para outros sistemas de transporte, por gerar um potencial eletronegativo no meio interno que serve de força motriz para o influxo de outros íons (GONZALEZ *et al.*, 2006; LINGWOOD *et al.*, 2006; HWANG & LEE, 2007).

A atividade da NKA pode ser afetada pela interação direta de agentes estressores, ou devido a um efeito indireto, através de danos causados por espécies reativas de oxigênio, o que pode levar à peroxidação de proteínas (DUCHNOWICZ *et al.*, 2005). A inibição da enzima NKA combinada com outros fatores como o aumento da permeabilidade da membrana, pode interferir na osmorregulação e regulação iônica (PRITCHARD, 1993). Agrotóxicos como os piretróides estão relacionados com a inibição da NKA em peixes (ASSIS *et al.*, 2009) e afetam principalmente o aporte de Na^+ e Cl^- . O aumento da atividade desta enzima também pode ocorrer na presença de agentes estressores pela ação do hormônio cortisol, que é responsável pela manutenção do balanço hidromineral (WENDELAAR BONGA, 1997).

A anidrase carbônica (AC) é uma importante enzima na regulação do equilíbrio ácido-básico (CHEW *et al.*, 2006) e contribui com a excreção do CO_2 que é transportado no plasma principalmente na forma de HCO_3^- (LAM *et al.*, 2006). Nos peixes, o equilíbrio ácido-básico está ligado à regulação iônica e a inibição da

atividade da AC pode afetar o balanço iônico, pois leva à diminuição da concentração de HCO_3^- e H^+ que seriam trocados por Cl^- e Na^+ , afetando a incorporação destes íons e a excreção de H^+ nas brânquias (CHEW *et al.*, 2006; GILMOUR & PERRY, 2009; PAULINO *et al.*, 2012). Os agrotóxicos podem interferir na atividade da NKA (DUCHOWICZ *et al.*, 2005; ASSIS *et al.*, 2009) e da AC (GILMOUR & PERRY, 2009; CEYHUN *et al.*, 2010), afetando as concentrações iônicas dos organismos aquáticos (MARTINEZ & CÓLUS, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005). Portanto, podem ser utilizadas como indicadores de toxicidade.

Os biomarcadores bioquímicos servem como sinais de alerta sobre a presença de contaminantes no ambiente, portanto, podem ser utilizados tanto para caracterizar os efeitos biológicos de exposição, quanto para determinar a biodisponibilidade de contaminantes nos sistemas aquáticos (SCHREIBER *et al.*, 2006). Dentre os biomarcadores bioquímicos mais extensivamente investigados estão as enzimas envolvidas na desintoxicação de substâncias tóxicas e de seus metabólitos, denominadas enzimas de biotransformação e de defesas antioxidantes (HERMES-LIMA, 2004). Quando um agente químico entra no organismo, ele é normalmente transportado por via sanguínea até órgãos onde poderão ser armazenados ou metabolizados para sua eliminação. Muitos desses compostos possuem propriedades lipofílicas, apresentando grande capacidade de atravessar as membranas biológicas, e podem causar danos aos componentes celulares (MARTINEZ, 2006). Para que um composto orgânico tóxico presente no organismo seja eliminado é necessário que haja um processo de biotransformação, que ocorre geralmente em duas etapas principais denominadas fase I e fase II, no qual o agente tóxico é convertido em uma forma mais hidrofílica, sendo mais facilmente eliminado (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Durante a primeira fase do processo de desintoxicação o xenobiótico sofre a ação de enzimas de biotransformação como as do complexo citocromo P450 denominadas CYPs, que além de atuar na eliminação de compostos tóxicos, também tem importante função na síntese de hormônios esteróides (SANDERSON, 2006). Embora seja encontrada em várias organelas e tecidos, esta família de enzimas está presente predominantemente no retículo endoplasmático das células do tecido hepático (VAN DER OOST *et al.*; 2003). O complexo P450 torna os

xenobióticos lipofílicos mais solúveis em água por meio de reações de oxidação, redução e hidrólise. Dessa forma, esses compostos são eliminados do organismo, ou produzem metabólitos que passam para a segunda fase do processo, onde são conjugados a compostos endógenos, para depois serem eliminados (VAN DER OOST *et al.*, 2003; MILLER, 2008).

Para peixes, a classe de isoenzimas da família do citocromo P450 responsável pela biotransformação de uma ampla variedade de xenobióticos (PAHs, PCBs, dioxinas e outros) é a subfamília CYP1A. A indução da CYP1A é estudada principalmente no fígado, mas também já foi observada em órgãos extra-hepáticos de peixes, como rim e brânquias (MOORE *et al.*, 2003). Estudos indicam que a isoforma CYP1A2 da subfamília CYP1A, é a mais importante enzima do complexo P450 envolvida no metabolismo das triazinas em humanos (HODGSON, 2001). Na presença de contaminantes, esta enzima pode ter sua atividade aumentada ou inibida em peixes (SANDERSON, 2006; SCHREIBER *et al.*, 2006; FERRARI *et al.*, 2007). Os metabólitos pró-oxidantes gerados por enzimas de fase I do processo de desintoxicação entram na fase II e ativam enzimas de biotransformação como as Glutathione-S-Transferases (GST) (FERRARI *et al.*, 2007). As GSTs representam importante família de enzimas primariamente citosólicas, envolvidas no processo de desintoxicação de fase II, conjugando os produtos resultantes da fase I com o tripeptídeo glutathione (GSH) para serem eliminados, reduzindo assim, a probabilidade desses agentes tóxicos se ligarem a outras macromoléculas celulares causando danos (STEGEMAN *et al.*, 1992; HEAT, 1995). Estas enzimas também podem apresentar função de peroxidase, atuando sobre compostos gerados por peroxidação lipídica e danos oxidativos do DNA (REED, 2008), sendo vista como importante no combate ao estresse oxidativo.

Durante o processo de desintoxicação espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas naturalmente pelas reações de oxidação e redução da célula. As ERO são produtos formados a partir da redução parcial do oxigênio molecular, que ocorre na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, e resulta no ânion radical superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e no radical hidroxil ($^{\bullet}OH$). Por serem altamente reativas, podem causar danos oxidativos a moléculas importantes

da constituição e funções celulares, como os lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (HERMES-LIMA, 2004; WILHELM FILHO, 2007; LUSHCHAK, 2011).

Para neutralizar essas ERO, o organismo conta com um aporte de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx). A SOD faz parte do grupo das metaloenzimas, sendo que a CuZn-SOD é a mais comumente encontrada nos organismos eucariotos. Esta enzima encontra-se primariamente no citoplasma, embora seja encontrada também nos lisossomos, peroxissomos e espaço intermembranas da mitocôndria, e catalisa a dismutação do O_2^{\bullet} em H_2O_2 e O_2 . A CAT é encontrada nos peroxissomos das células e atua especificamente na remoção do H_2O_2 , que é decomposto em H_2O e O_2 . A GPx é uma enzima citosólica que age sobre uma variedade de peróxidos orgânicos, inclusive o H_2O_2 , utilizando a GSH na sua forma reduzida como cofator ($H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O$) (VAN DER OOST *et al.*, 2003; HERMES-LIMA, 2004). Estudos com peixes expostos a diferentes agrotóxicos têm evidenciado alterações nos componentes antioxidantes da célula (ORUÇ & USTA, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2006; MIKULA *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010 a, b), indicando que a presença destes no ambiente aquático pode prejudicar a saúde destes animais.

Além dos componentes antioxidantes enzimáticos, as células contam também com antioxidantes não enzimáticos como o tripeptídeo GSH, o ácido ascórbico, entre outros. A GSH encontra-se no meio intracelular, porém pode ser encontrada em baixas concentrações no fluido extracelular, além de participar de reações catalisadas pela GST ou como cofator para GPx. O aumento ou redução dos níveis de GSH no organismo podem funcionar como biomarcadores para a compreensão dos efeitos tóxicos de substâncias presentes no ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003; HERMES-LIMA, 2004).

Os pesticidas podem induzir o estresse oxidativo por diferentes mecanismos: ao interferir no ciclo redox doando ou recebendo elétrons de constituintes celulares, o que leva ao aumento da produção de ERO; exaurindo as reservas de redutores como a glutathiona e, conseqüentemente, diminuindo o potencial antioxidante; inativando enzimas antioxidantes; interferindo no suplemento de energia necessária para o metabolismo e desintoxicação ou modificando processos vitais como transcrição e tradução (LUSHCHAK, 2011). A prevalência de

compostos pró-oxidantes sobre as defesas antioxidantes do organismo pode levar ao estresse oxidativo causando severos danos à célula, podendo comprometer suas funções e até levá-la à morte (STOREY, 1996; AVILEZ *et al.*, 2008).

Uma das consequências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, considerada a maior causa de injúria e morte celular (HERMES-LIMA, 2004). Trata-se de uma reação em cadeia que tem início quando um radical livre retira um átomo de hidrogênio do grupo metileno de um ácido graxo poli-insaturado da membrana, formando um radical lipídico (R^*). Em seguida, ocorre a propagação da reação com a formação de radical peroxil (ROO^*), devido a reação do radical lipídico com O_2 . O radical peroxil formado acaba reagindo com ácidos graxos poli-insaturados adjacentes, capturando o hidrogênio e dando origem ao hidroperóxido lipídico ($ROOH$). Assim, novos R^* são formados nos ácidos graxos insaturados, e as reações seguem desestruturando a membrana até que ocorra a reação entre dois radicais lipídicos, ou que sejam decompostos em alta temperatura ou na presença de íons (VAN DER OOST *et al.*, 2003; HERMES-LIMA, 2004). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da peroxidação lipídica e pode ser quantificado pelo ensaio com as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), podendo ser uma ferramenta útil para avaliar a lipoperoxidação (RAEL *et al.*, 2004).

O bom funcionamento neuromuscular é essencial para a realização de tarefas necessárias a sobrevivência no ambiente aquático como orientação, localização e busca por alimento, fuga de predadores e reprodução (DUTTA & ARENDS, 2003). O neurotransmissor acetilcolina é o responsável pela transmissão do impulso nervoso na placa motora que desencadeia a contração muscular para a locomoção. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina nas fendas sinápticas e placa motora, limitando o tempo de ação desse neurotransmissor na transmissão do impulso nervoso. Quando a AChE é inibida, ocorre estímulo contínuo da célula pós sináptica, que pode resultar em tetania da musculatura, paralisia e até morte do animal (KIRBY, 2000). A AChE é um antigo biomarcador para organofosforados e carbamatos, que são conhecidos inibidores desta enzima, como evidenciado por vários estudos sobre a toxicidade destes sobre a atividade da enzima em peixes (BRETAUD *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002; DUTTA & ARENDS, 2003; CHANDRASEKARA & PATHIRATNE, 2005;

DURMAZ *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2006; KAVITHA & RAO, 2007). Alguns dos efeitos de agrotóxicos em concentrações subletais sobre a AChE observados em estudos com peixes, são alterações do comportamento como: tremores, letargia, diminuição dos movimentos, aumento da frequência respiratória, natação errática e interferência na tomada de alimento (FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002; MIRON *et al.*, 2005). Essas alterações podem afetar o desenvolvimento e reprodução do animal, pois exigem um gasto excessivo de energia (RAHIMI & ABDOLLAHI, 2007). Além dos organofosforados e carbamatos, outros agrotóxicos também têm mostrado efeitos neurotóxicos, afetando o processo de transmissão colinérgica em peixes, como o glifosato para *L. obtusidens* e *P. lineatus* (GLUSCZAK *et al.*, 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010 b), o clomazone para *L. obtusidens* e *R. quelen* (MIRON *et al.*, 2005; MIRON *et al.*, 2008), o diflubenzuron para *P. lineatus* (PEREIRA MADUENHO & MARTINEZ, 2008) e o herbicida 2, 4 diclorofenoxiacético (2,4 D) para *R. quelen* (CATTANEO *et al.*, 2008). Devido a grande importância da atividade da AChE para o organismo, esta enzima tem grande potencial para ser utilizada como biomarcador em monitoramento de áreas agrícolas.

Os danos causados pelos agentes tóxicos nem sempre ficam restritos aos componentes citoplasmáticos e de membranas da célula, mas podem atingir também o núcleo celular, afetando o material genético. Muitos são capazes de induzir a quebra da molécula de DNA e/ou provocar modificações em suas bases (VAN DER OOST *et al.*, 2003; HERMES-LIMA, 2004). Essas alterações podem ocorrer de forma direta, quando a substância tóxica liga-se à molécula de DNA formando adutos por ligação covalente, promovendo quebras da fita ou alterações químicas das bases; ou de forma indireta, por danos oxidativos devido a geração excessiva de ERO, ou por impedir a reparação da molécula por enzimas (HERMES-LIMA, 2004). Estudos com peixes expostos a agrotóxicos têm evidenciado fragmentações da molécula de DNA desses animais (ÇAVAŞ & KÖNEN, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2008; POLARD *et al.*, 2011). O ensaio do cometa tem sido muito utilizado para medir quantitativamente esses danos em organismos aquáticos, por se tratar de uma técnica rápida e sensível. Portanto, os danos no DNA causados pela exposição a contaminantes são bons biomarcadores para avaliar a toxicidade de contaminantes nos organismos aquáticos (VAN DER OOST *et al.*, 2003; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Devido às informações fornecidas pelos biomarcadores a respeito da toxicidade de agentes tóxicos para peixes, os resultados integrados de parâmetros como os hematológicos, osmo-iônicos, metabólicos e bioquímicos são importantes para a avaliação da saúde dos peixes e para o monitoramento de ambientes impactados.

2. OBJETIVOS

- Avaliar os possíveis efeitos da exposição aguda aos herbicidas clomazone e ametrina para a espécie de peixe *P. lineatus*, utilizando alguns parâmetros funcionais como indicadores de toxicidade dos herbicidas.
- Comparar a toxicidade do princípio ativo ametrina e do produto formulado a base de ametrina, o Gesapax[®] 500, para *P. lineatus*.
- Investigar entre os parâmetros funcionais de *P. lineatus*, biomarcadores que forneçam informações relevantes sobre efeitos da exposição aguda aos herbicidas ametrina e clomazone, e que possam ser utilizados em monitoramento de ambientes impactados.

3. PARTE I – ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NO PEIXE *Prochilodus lineatus* PROVOCADAS PELO HERBICIDA CLOMAZONE¹

Lindalva Pereira^{2,3}

Marisa N. Fernandes^{4,c}

Cláudia B. R. Martinez^{b*}

RESUMO

O uso indiscriminado de herbicidas tem levado à contaminação dos corpos d'água, podendo afetar a saúde da biota aquática. Assim, para avaliar os possíveis efeitos do herbicida à base de clomazone (Gamit[®] 500) para o peixe *Prochilodus lineatus*, juvenis foram expostos por 96 h a três concentrações (1, 5 e 10 mg.L⁻¹) do clomazone e foram analisados parâmetros hematológicos: hemoglobina (Hb); hematócrito (Hcto); número de eritrócitos (RBC); volume corpuscular médio (VCM); hemoglobina corpuscular média (HCM); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e bioquímicos: glutationa-S-transferase (GST); catalase (CAT); glutationa peroxidase (GPx) e acetilcolinesterase (AChE). O Hcto apresentou diminuição significativa na concentração de 10 mg.L⁻¹, enquanto que os parâmetros Hb, HCM e CHCM apresentaram diminuição significativa nas duas maiores concentrações, refletindo um quadro anêmico. O RBC teve aumento significativo na menor concentração, podendo estar relacionado à liberação de eritrócitos jovens na corrente sanguínea, em função de contração esplênica, que pode ocorrer como uma resposta adaptativa ao agente estressor. *P. lineatus* apresentou ativação da via de biotransformação, constatada pelo aumento da atividade hepática da enzima GST e ativação hepática da enzima antioxidante CAT nas concentrações mais elevadas. A GPx hepática apresentou inibição significativa nas maiores concentrações, podendo indicar eficiente atuação da CAT na eliminação do H₂O₂ ou, pela competição pelo

¹ **Nota:** Manuscrito original enviado para publicação no periódico Chemosphere.

² ^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, Km 374, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná – Brasil.

³ ^cPrograma de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais- Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luis, Km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo – Brasil.

⁴ ^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luis, Km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo – Brasil.

mesmo substrato (GSH) com a GST. A atividade cerebral e muscular da AChE foi inibida nas maiores concentrações, indicando efeitos neurotóxicos do herbicida no peixe. As alterações hematológicas e bioquímicas evidenciadas permitiram concluir que o herbicida clomazone apresenta efeitos tóxicos sobre a espécie *P. lineatus* sendo que sua presença no ambiente pode comprometer a saúde desses e de outros animais.

Palavras-chave: acetilcolinesterase, antioxidantes, biomarcadores, biotransformação.

3. 1. INTRODUÇÃO

A literatura acumula informações sobre o aumento do consumo de agrotóxicos nas últimas décadas. Em 2008, o Brasil assumiu a liderança no consumo mundial de agrotóxicos (SINDAG, 2009 a), sendo que a classe mais consumida é a dos herbicidas. No Brasil o consumo de herbicidas correspondeu aproximadamente a 59% do total comercializado em 2009 (SINDAG, 2009 b). Entre os herbicidas mais utilizados está o clomazone 2-[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona, que pertence ao grupo químico isoxazolidinona e age como inibidor da síntese de carotenóides, e cuja atividade herbicida está relacionada com seus metabólitos como o 5- ceto clomazone (EPA, 2007), ativados pelo sistema monooxigenase P₄₅₀ (FERHATOGLU *et al.*, 2005). Este herbicida tem sido muito utilizado nas lavouras no controle pré e pós-emergente de plantas infestantes. Em 2009, o clomazone ficou entre os dez herbicidas mais utilizados no Brasil (IBAMA, 2010).

Os produtos químicos liberados no ambiente acabam por atingir os sistemas aquáticos, contaminando e ou afetando a biota aquática, incluindo os peixes, através do contato direto da superfície do corpo e das brânquias desses animais com a água contaminada, ou ainda, por meio do alimento. Uma vez no organismo, esses produtos podem provocar efeitos tóxicos (ERICKSON *et al.*, 2008). O clomazone apresenta alta solubilidade na água (1.100 mg.L⁻¹ segundo a EPA, 2007), o que aumenta seu potencial de contaminação das águas superficiais e, provavelmente, também das águas subterrâneas (PRIMEL, 2005).

Estudos já comprovaram a presença de clomazone nas águas localizadas em áreas de cultivo de cana-de-açúcar (ARMAS & MONTEIRO, 2005) e de arroz (PRIMEL, 2005). Trabalhos realizados em áreas de cultivo de arroz irrigado mostram que este herbicida é tóxico para espécies de peixes neotropicais como *Rhamdia quelen* (jundiá) e *Leporinus obtusidens* (piava) (MIRON *et al.*, 2005; CRESTANI *et al.*, 2006; CRESTANI *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2007; MIRON *et al.*, 2008). Na cultura da cana de açúcar, o herbicida clomazone também é bastante utilizado, o que estabelece um alerta, já que a área de cultivo desta monocultura vem sendo fortemente ampliada no território brasileiro.

A exposição a contaminantes pode causar alterações biológicas nos organismos. Estas alterações são passíveis de serem mensuradas e podem ser utilizadas como indicadores de exposição ou efeitos de poluentes ambientais, sendo estas, denominadas biomarcadores. Esses biomarcadores podem permitir uma rápida avaliação da saúde do organismo e ainda alertar sobre possíveis riscos ambientais (MAYER *et al.*, 1992; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Entre as alterações biológicas os parâmetros hematológicos são considerados potenciais biomarcadores de exposição a agentes químicos, uma vez que estes podem induzir o aumento ou decréscimo nos diferentes componentes hematológicos (HEATH, 1995; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Dentre os biomarcadores bioquímicos, os mais extensivamente investigados são as enzimas envolvidas na desintoxicação de agentes tóxicos e de seus metabólitos, ou seja, as enzimas de biotransformação e as de defesas antioxidantes. Os peixes, assim como os demais animais, possuem enzimas de biotransformação, cuja principal função é catalisar a conversão de compostos orgânicos lipossolúveis em metabólitos hidrossolúveis, mais facilmente excretáveis (LIVINGSTONE, 1998). Esta biotransformação envolve a fase I do processo de desintoxicação, hidrolisando o composto tóxico que poderá ser eliminado ou continuar na via de biotransformação (VAN DER OOST *et al.*, 2003; DI GIULLIO & HINTON, 2008). Na fase II, ocorre a conjugação dos metabólitos produzidos na fase I com compostos endógenos das células como peptídeos, açúcares ou sulfatos, resultando em produtos solúveis em água, que são facilmente excretados (DI GIULLIO *et al.*, 1995). As enzimas da família das glutatona-S-transferases (GSTs)

atuam na fase II do processo de desintoxicação, reduzindo a probabilidade desses compostos se ligarem a outras macromoléculas celulares (STEGEMAN *et al.*, 1992).

Durante a biotransformação de xenobióticos ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem danificar estruturas celulares por oxidação. Para minimizar os efeitos dessas ERO as células contam com enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase, envolvidas no processo antioxidante (STOREY, 1996; VAN DER OOST *et al.*, 2003). Determinados agrotóxicos induzem o aumento da atividade das enzimas de biotransformação GST e de estresse oxidativo (DORVAL *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2006). Portanto, a atividade enzimática pode ser um indicador útil da presença de contaminantes no organismo.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima que modula a transmissão do impulso nervoso dos neurônios colinérgicos. Esta enzima é um antigo biomarcador para inseticidas organofosforados, que são conhecidos como potentes inibidores da sua atividade (PAYNE *et al.*, 1996; FULTON & KEY, 2001; VAN DER OOST *et al.*, 2003; ORUÇ & USTA, 2007). Além destes pesticidas a AChE também responde a uma série de outros agrotóxicos como o glifosato para *P. lineatus* e *Leporinus obtusidens* (GLUSCZAK *et al.*, 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010 b), o clomazone para *L. obtusidens* e *Rhamdia quelen* (MIRON *et al.*, 2005; MIRON *et al.*, 2008) e o herbicida 2, 4 diclorofenoxiacético (2,4 D) para *R. quelen* (CATTANEO *et al.*, 2008), apresentando grande potencial para a avaliação e monitoramento ambiental (PAYNE *et al.*, 1996).

Trabalhos sobre os efeitos de agentes tóxicos sobre os organismos aquáticos permitem estabelecer limites de concentração de substâncias tóxicas aceitáveis no ambiente, sem causar danos significativos à biota residente, sendo indispensáveis para se conhecer riscos e apresentar recomendações quanto ao uso de pesticidas (RAND & PETROCELLI, 1985; RAND, 1995). Dentre os organismos aquáticos os peixes ocupam uma posição de destaque no campo da toxicologia aquática (DI GIULLIO & HINTON, 2008). O peixe *Prochilodus lineatus* (Ordem Characiformes) é uma espécie neotropical que vem se destacando comercialmente no sul do Brasil devido a seu fácil cultivo em pisciculturas (WINKALER *et al.*, 2007). Testes de toxicidade com *P. lineatus* mostram que esta espécie é sensível a uma variedade de pesticidas, sendo considerada uma espécie bioindicadora em potencial

(LANGIANO & MARTINEZ, 2008; PEREIRA MADUENHO & MARTINEZ, 2008; MODESTO & MARTINEZ, 2010 b).

Assim, a análise integrada dos resultados obtidos nos parâmetros sanguíneos e bioquímicos de *P. lineatus* tem por objetivo avaliar os possíveis efeitos do herbicida à base de clomazone (Gamit[®] 500) para esta espécie, utilizando alguns parâmetros bioquímicos e fisiológicos como indicadores de toxicidade.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Organismos Teste

Exemplares jovens da espécie *P. lineatus* (VALENCIENNES, 1847) com peso de $4,15 \pm 1,78$ g e comprimento total de $7,82 \pm 0,59$ cm (média \pm desvio padrão) foram obtidos na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Os peixes foram aclimatados por sete dias em tanques de 300 L, contendo água desclorada, sob aeração constante e fotoperíodo de 12h:12 h. Durante o período de aclimação os animais foram alimentados com ração comercial (36% de proteína - Guabi[®], BR) a cada 48 horas. A alimentação foi suspensa 24 horas antes e durante os testes de toxicidade. Os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados diariamente durante o período de aclimação (média \pm desvio padrão) (temperatura: $22,25 \pm 0,64$ °C; pH: $7,12 \pm 0,12$; OD: $6,54 \pm 0,03$ mg O₂. L⁻¹; condutividade: $62 \pm 4,32$ μ S.cm⁻¹).

3.2.2. Testes de Toxicidade

Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para aquários de vidro de 80 L, divididos em grupos de 10 a 12 animais por aquário, de forma a manter a densidade menor que 1 g.L⁻¹: um grupo controle (0 mg.L⁻¹), em que os peixes foram expostos apenas a água e três grupos experimentais em que os peixes foram expostos em água contendo o produto formulado Gamit[®]500, em diferentes concentrações nominais do herbicida clomazone (1, 5, e 10 mg.L⁻¹) por um período de 96 h. Não houve renovação de água durante o período dos testes. O

uso dessas concentrações se baseou em estudos prévios da toxicidade do clomazone com outras espécies neotropicais como piavas (*Leporinus obtusidens*) e jundiás (*Rhamdia quelen*) (MIRON *et al.*, 2005; CRESTANI *et al.*, 2006; CRESTANI *et al.*, 2007). Os parâmetros físicos e químicos da água foram observados diariamente durante o período experimental (média \pm desvio padrão): temperatura $23,10 \pm 0,29$ °C; pH $7,07 \pm 0,25$; OD $6,86 \pm 0,47$ mg O₂. L⁻¹; condutividade: $64 \pm 2,94$ μ S.cm⁻¹).

3.2.3. Amostragem

Após o período experimental de 96 h, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g.L⁻¹) e o sangue foi retirado pela veia caudal utilizando seringas heparinizadas, para análises dos parâmetros sanguíneos. Após a retirada do sangue, os animais foram mortos por secção medular e, em seguida, retirados o fígado e o cérebro e armazenados a - 80 °C para a posterior análise enzimática. Os procedimentos adotados seguem protocolo do Comitê de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

3.2.4. Análises Hematológicas

O hematócrito (Hcto) foi determinado de acordo com a técnica do microhematócrito em capilares heparinizados e centrífuga apropriada. A concentração de hemoglobina (Hb) foi estimada por meio de método da cianometahemoglobina utilizando-se kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) em 540 nm. O número de eritrócitos (RBC) foi determinado utilizando-se amostras de sangue fixadas em tampão formol-citrato (citrato de sódio diluído em 0,4% de formol em solução) e a contagem foi feita em câmara de Neubauer no microscópio óptico (400 x) sendo o resultado expresso em número de células por milímetro cúbico (nº céls.mm³). A partir dos dados de Hcto, Hb e RBC, foram calculados os índices hematológicos VCM, HCM e CHCM.

3.2.5. Análises Bioquímicas

As amostras de tecido hepático foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0) na proporção de 1:10 (p/v). Em seguida, centrifugados (20 min, 10.000 g, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para as análises.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), através do decréscimo de absorbância em 240 nm (BEUTLER, 1975). A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ metabolizado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína⁻¹.

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada pelo método de Hopkins & Tudhope (1973) baseado na oxidação do NADPH + H⁺ em presença de hidroperóxido, em 340 nm. Os valores para a atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol NADPH oxidado. min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína⁻¹.

A atividade da GST foi determinada seguindo-se a complexação da glutathiona reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), em 340 nm (KEEN *et al.*, 1976). Os valores para a atividade da GST foram expressos em $\text{nmol CDNB conjugado. min}^{-1}.\text{mg}$ de proteína⁻¹.

Amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,5) na proporção de 1:10 (p/v). O homogeneizado foi centrifugado (10.000 g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios da AChE pelo método de Ellman *et al.* (1961), adaptado para microplaca, como descrito por Alves Costa *et al.* (2007). Para a determinação da atividade da AChE foi utilizado o substrato iodeto de acetiltiocolina (9 mM) e o reagente de cor DTNB ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (0.5 mM) a 415 nm, e a atividade foi expressa em $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}$ de proteína⁻¹.

A concentração de proteína para todos os homogeneizados foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951), em espectrofotômetro a 700 nm, utilizando-se albumina de soro bovino como padrão e expressa em mg.L^{-1} .

3.2.6. Análise Estatística

Os valores médios obtidos para cada variável analisada nas diferentes concentrações experimentais foram comparados entre si por meio de análise de variância paramétrica ANOVA, após teste de normalidade. Quando indicado, as diferenças foram identificadas por meio de teste de comparação múltiplas (Student-Newman-Keuls). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Parâmetros Hematológicos

Observou-se diminuição significativa do Hcto ($P = 0,006$) na concentração de 10 mg.L^{-1} em comparação com os demais grupos (Fig. 1 A), e da Hb ($P < 0,001$) nas concentrações de 5 e 10 mg.L^{-1} em comparação com os grupos 0 e 1 mg.L^{-1} (Fig. 1 B). O RBC mostrou aumento significativo ($P = 0,024$) na concentração de 1 mg.L^{-1} com relação ao grupo CTR (0 mg.L^{-1}) (Fig. 1 C) e o VCM permaneceu inalterado ($P = 0,455$) (Fig. 1 D). Entretanto, o HCM e o CHCM, apresentaram diminuição significativa ($P = 0,001$ e $P < 0,001$ respectivamente) nas concentrações de 5 e 10 mg.L^{-1} em relação aos grupos 0 e 1 mg.L^{-1} (Fig. 1 E e 1F).

3.3.2. Parâmetros Bioquímicos

Os resultados obtidos para a GST hepática indicaram um aumento significativo ($P < 0,001$) na atividade desta enzima nos animais expostos às concentrações de 5 e 10 mg.L^{-1} de clomazone em relação ao grupo 0 e 1 mg.L^{-1} (Fig. 2 A). A CAT também aumentou significativamente ($P < 0,001$) nas concentrações de 5 e 10 mg.L^{-1} , que se mostraram diferentes entre si e dos grupos 0 e 1 mg.L^{-1} (Fig. 2 B). A GPx teve sua atividade reduzida significativamente ($P = 0,004$) nas concentrações de 5 e 10 mg.L^{-1} quando comparada com os grupos 0 e 1 mg.L^{-1} (Fig. 2 C). Os resultados mostraram inibição significativa ($P < 0,001$) da atividade da AChE cerebral nos peixes expostos às concentrações de 5 e 10 mg.L^{-1} de clomazone por 96 h, em relação aos grupos 0 e 1 mg.L^{-1} (Fig. 3).

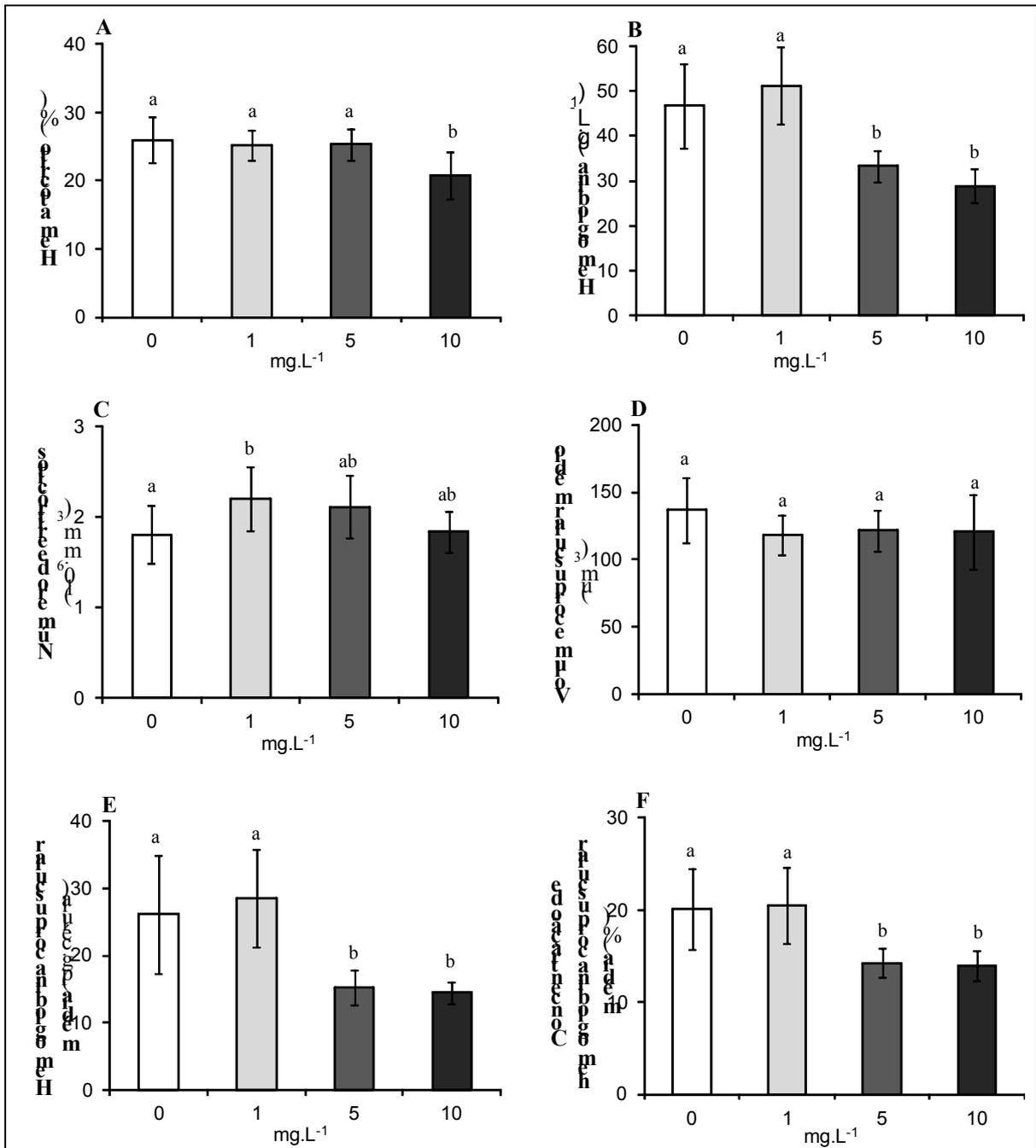


Figura 1. Valores médios e desvio padrão (n = 10-12) do hematócrito (A), concentração de hemoglobina (B), número de eritrócitos (C), volume corpuscular médio (D), hemoglobina corpuscular média (E) e concentração de hemoglobina corpuscular média (F) de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações (1, 5 e 10 mg.L⁻¹) de clomazone ou somente a água (0) por 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05).

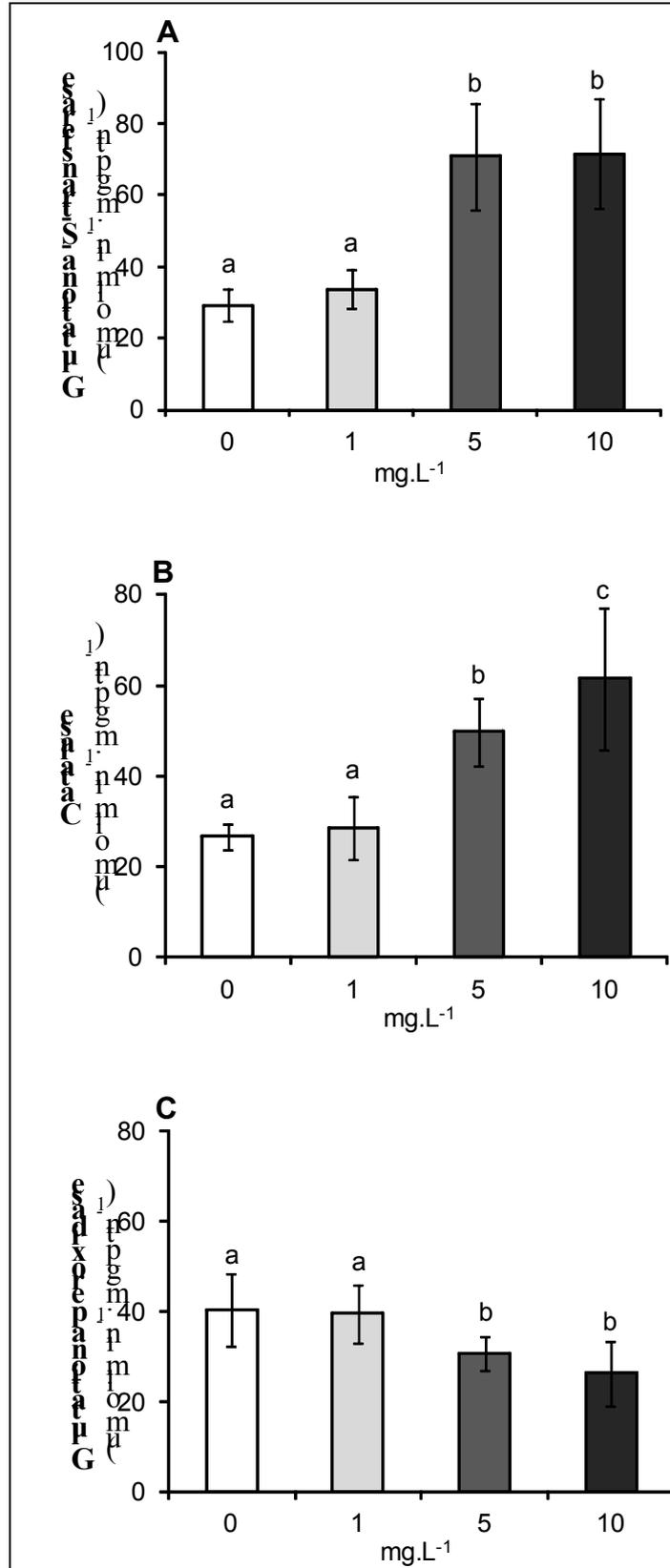


Figura 2. Valores médios e desvio padrão (n = 10-12) da atividade hepática da glutathione-S-transferase (A), catalase (B) e glutathione peroxidase (C) de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações (1, 5, e 10 mg.L⁻¹) de clomazone ou somente a água (0), por 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05).

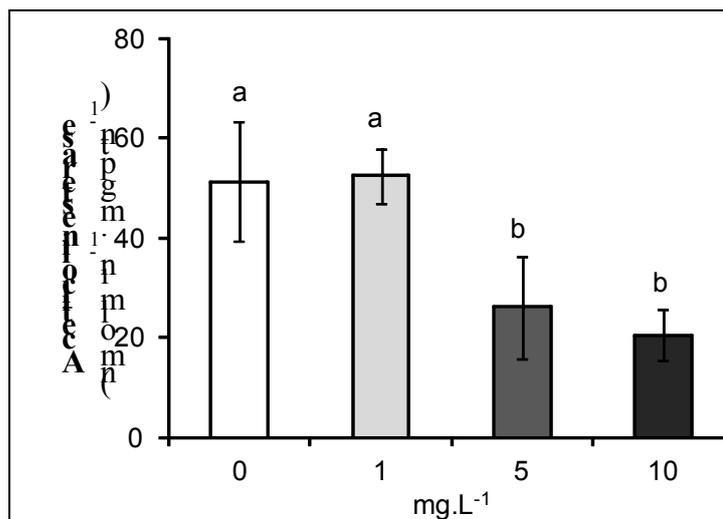


Figura 3. Valores médios e desvio padrão (n = 10-12) da acetilcolinesterase cerebral de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações (1, 5, e 10 mg.L⁻¹) de clomazone ou somente a água (0), por 96 h. Letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05).

3.4. DISCUSSÃO

Os parâmetros hematológicos são potenciais biomarcadores de exposição a agrotóxicos, devido a sua sensibilidade a certos agentes tóxicos (Heath, 1995). Nas análises realizadas, os peixes expostos ao clomazone apresentaram decréscimo significativo do Hcto na concentração de 10 mg.L⁻¹ em comparação aos grupos testados nas concentrações 0, 1 e 5 mg.L⁻¹. A concentração de hemoglobina (Hb), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) também mostraram valores significativamente mais baixos nas concentrações de 5 e 10 mg.L⁻¹, com relação ao grupo 0 mg.L⁻¹ e ao grupo experimental submetido a concentração de 1 mg.L⁻¹. O clomazone também causou diminuição do Hcto na espécie de peixe neotropical *R. quelen* exposta a concentrações de 0,5 e 1 mg.L⁻¹ em 96 h de exposição (CRESTANI *et al.*, 2006). Não foram constatadas alterações significativas no número de eritrócitos (RBC) nas concentrações de 5 e 10 mg.L⁻¹. O RBC pode permanecer relativamente inalterado em estudos de toxicidade a curto prazo (EVANS, 2008). É possível que tenha ocorrido uma redução na quantidade de hemoglobina no eritócito (HEATH, 1995), por interferência na síntese dessa proteína. Esses resultados expressam um provável quadro de anemia, pois é sabido que muitos poluentes químicos como os agrotóxicos podem induzir a anemia em peixes (HEATH, 1995; MIN & KANG, 2008). Essa anemia pode ser em decorrência de injúrias oxidativas causadas por espécies

reativas de oxigênio, por oxidação da hemoglobina ou outros componentes celulares (BLOOM & BRANDT, 2008). No entanto, um aumento significativo no número de eritrócitos (RBC) foi constatado na menor concentração (1 mg.L^{-1}) quando comparado com os demais grupos. O aumento deste parâmetro pode ocorrer em situações de estresse agudo em que o estímulo adrenérgico desencadeia a contração esplênica, liberando grande quantidade de eritrócitos na corrente sanguínea (HEATH, 1995). Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o clomazone promove alterações sanguíneas que podem interferir na tomada de oxigênio e isso pode comprometer a saúde do animal como um todo.

O fígado é a principal local de desintoxicação em peixes (Hinton *et al.*, 2008). O processo de desintoxicação requer uma série de reações que envolvem enzimas de biotransformação como a GST e antioxidantes como a CAT e a GPx. O grupo de enzimas GST catalisa a conjugação da GSH com uma variedade de compostos endógenos tornando-os mais hidrofílicos, que são menos permeáveis às membranas e mais fáceis de serem eliminados (HEATH, 1995; DI GIULLIO & HINTON, 2008). Portanto, o trabalho destas enzimas impede danos oxidativos a componentes celulares (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Os resultados observados no presente estudo mostram que a GST teve sua atividade aumentada nos peixes expostos a 5 e 10 mg.L^{-1} de clomazone em comparação com os grupos 0 e 1 mg.L^{-1} . O aumento da atividade da GST tem sido associado com uma adaptação do organismo contra uma variedade de compostos orgânicos presentes no ambiente (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Aumento significativo na atividade hepática da GST também foi verificado em *P. lineatus* expostos a 10 mg.L^{-1} do herbicida Rondup[®] por períodos de 24 a de 96 h (MODESTO & MARTINEZ, 2010 a). Os dados obtidos no presente estudo indicam a indução da fase II do processo de desintoxicação e a atuação da enzima GST na metabolização do herbicida clomazone.

A eliminação de hidroperóxidos faz parte do mecanismo de proteção celular contra estresse oxidativo e conseqüente peroxidação lipídica (Van der Oost *et al.*, 2003). A CAT e a GPx são enzimas que desempenham importante papel na inibição e/ou prevenção de danos oxidativos (HERMES-LIMA, 2004). A CAT atua especificamente na eliminação do H_2O_2 , produzindo O_2 e H_2O enquanto que GPx

catalisa a redução de uma variedade de hidroperóxidos orgânicos, entre eles o H_2O_2 . No presente estudo foi verificado aumento significativo da atividade da CAT nas concentrações de 5 e 10 $mg.L^{-1}$ de clomazone, quando comparadas com o grupo 0 e 1 $mg.L^{-1}$. Resultados semelhantes foram observados em piavas (*L. obtusidens*) após 30 dias de exposição a 0,5 $mg.L^{-1}$ deste mesmo herbicida (MORAES *et al.*, 2007). Entretanto, resultado diferente foi observado em experimento com *R. quelen* expostas a 0,5 e 1,0 $mg.L^{-1}$ de clomazone por 12, 24, 48 e 96 h (CRESTANI *et al.*, 2007), indicando que as espécies diferentes respondem diferentemente ao mesmo contaminante. O aumento da atividade da CAT neste estudo indica intensa produção de H_2O_2 , provavelmente proveniente da metabolização do clomazone, como uma proteção do organismo contra danos oxidativos, uma vez que esta enzima atua especificamente sobre H_2O_2 . Como a catalase é uma enzima peroxissomal, o aumento da sua atividade pode refletir também a proliferação dos peroxissomos, devido a ativação das vias antioxidantes (SYAKALIMA *et al.*, 2006). A atividade reduzida GPx hepática em *P. lineatus* expostos às concentrações de 5 e 10 $mg.L^{-1}$ clomazone por 96 h, pode estar relacionada a um esgotamento do substrato GSH, utilizado nas reações de conjugação catalisadas pela GST (que teve sua atividade aumentada nessas concentrações) ou à competição entre GPx e CAT pelo mesmo substrato (H_2O_2), uma vez que ambas atuam na conversão do peróxido de hidrogênio (DRÖGE, 2002) e a CAT mostrou elevação na atividade nas concentrações mais altas, ou seja, estava ativa sobre o substrato H_2O_2 .

Alguns pesticidas, como os organofosforados e carbamatos, são conhecidos como potentes inibidores da acetilcolinesterase (FULTON & KEY, 2001; VAN DER OOST *et al.*, 2003; ORUÇ & USTA, 2007). Com a inibição da atividade da AChE a acetilcolina não será hidrolisada, causando excessiva estimulação das vias colinérgicas e conseqüente diminuição do controle neural e muscular (DUTTA & ARENDS, 2003). No presente estudo a atividade da AChE no tecido cerebral dos peixes expostos ao clomazone apresentou-se diminuída nas concentrações de 5 e 10 $mg.L^{-1}$ quando comparada aos peixes dos grupos 0 e 1 $mg.L^{-1}$. Estudo com *R. quelen* expostos a diferentes concentrações do herbicida clomazone (5, 10 e 20 $mg.L^{-1}$) durante 96 h, também constatou inibição da AChE (MIRON *et al.*, 2005). Em estudo posterior, a mesma espécie se mostrou sensível a concentrações mais

baixas do produto, apresentando inibição da AChE cerebral quando expostas a 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹, em 12, 24, 48, 96 e 192 h de exposição (CRESTANI *et al.*, 2007). Em *L. obtusidens* também houve diminuição significativa da atividade da AChE em tecido cerebral, quando expostos a concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de clomazone por períodos de 96 e 192 h (MORAES *et al.*, 2007; MIRON *et al.*, 2008).

Estudos mostram que a inibição da AChE provoca hiperatividade, tremores e convulsões que aumenta o gasto energético, que provoca letargia e pode até levar à morte (MIRON *et al.*, 2005; RAHIMI & ABDOLLAHI, 2007). *P. lineatus*, é uma espécie migradora de longas distâncias, necessitando se locomover por centenas de quilômetros até as áreas de desova (SIVASUNDAR *et al.*, 2001), portanto, requer energia e boas condições neuromusculares. Assim, inibidores da AChE como o clomazone, podem interferir no processo reprodutivo desta espécie. Portanto, esta enzima pode ser indicada como um biomarcador para avaliar a toxicidade desse herbicida nos ambientes aquáticos.

Os resultados observados no presente trabalho mostraram que a exposição ao herbicida clomazone, nas concentrações de 5 e 10 mg.L⁻¹ por 96 h, pode causar importantes alterações nos parâmetros sanguíneos e bioquímicos de *P. lineatus*, além de se mostrar neurotóxico para esta espécie. Os dados obtidos indicam que o herbicida clomazone, uma vez presente nos ambientes aquáticos, pode ser prejudicial à saúde de *P. lineatus* e este prejuízo provavelmente se estenda a outros organismos aquáticos.

Agradecimentos

Este trabalho é parte da tese de doutorado de L. Pereira realizado junto ao Programa de pós-graduação de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os autores agradecem à Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes, a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. M. N. Fernandes e C. B. R. Martinez são bolsistas de produtividade do CNPq e participam do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5).

3.5. REFERÊNCIAS

- Alves Costa, J.R.M.; Mela, M.; Silva de Assis, H.C.; Pelletier, E.; Randi, M.A.F.; Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 67, 82–88.
- Armas, E.D.; Monteiro, R.T.R., 2005. Uso de agrotóxicos em cana de - açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Quím. Nova.** 28, 975-982.
- Beutler, E., 1975. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods.** Grune&Straton, New York.
- Bloom, J.C., Brandt, J.T., 2008. Toxic responses of the blood. In: Casarett, L.J., Klaassen, C.D. Casarett and Doull's, **Toxicology: the basic science of poisons**, 7 ed. McGraw-Hill Medical, New York. pp 455-484.
- Cattaneo, R.; Loro, V.L.; Spanevello, R.; Silveira, F.A.; Luz, L; D.S. Miron, D.S.; Fonseca, M.B.; Moraes, B.S.; Clasen, B., 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pest. Biochem. Physiol.** 92, 133–137.
- Crestani, M.; Menezes, C.; Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Lazzari, R.; Duarte, M.F.; Morsch, V. M.F.; Pippi, A.L.; Vieira, V.P., 2006. Effect of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 65, 48-55.
- Crestani, M.; Menezes, C.; Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Spanevello, R.; Silveira, A.; Gonçalves, F.F.; Zanella, R.; Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere.** 67, 2305-2311.
- Di Giulio, R.T.; Benson, W.H.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity, In: Rand, G.M. (Ed.), **Fundamentals of Aquatic Toxicology.** Effects, Environmental Fate and Risk Assessment, 2nd ed. Taylor & Francis, Washington. pp 523–561.
- Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E., 2008. **The Toxicology of fishes.** Taylor & Francis.
- Dorval, J.; Leblond, V.S.; Hontela, A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. **Aquat. Toxicol.** 63, 229-241.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. **Phys. Rev.** 82, 47- 95.
- Dutta, H. M.; Arends, D.A., 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environ. Res.** 91, 157- 162.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres Jr., V.; Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.** 7, 88–95.

EPA (Environmental Protection Agency), 2007. **Clomazone Summary Document Registration Review: Initial Docket January, 2007.** http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/clomazone/. Acesso em 04/2010.

Erickson, R.J.; Nichols, J.W.; Cook, P.M.; Ankley, G.T., 2008. Bioavailability of chemical contaminants in aquatic system. In: Di Giulio, R.T, Hinton, E.D. (Eds). **The Toxicology**, Taylor & Francis. pp 523–561.

Evans, G.O., 2008. **Animal Hematology: A Practical, Guide for Toxicologists and Biomedical Researchers.** Taylor & Francis.

Ferhatoglu, Y.; Avdiushko, S.; Barrett, M., 2005. The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. **Pestic. Biochem. Physiol.** 81, 59–70.

Fulton, M.H. Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environ. Toxicol. Chem.** 20, 37- 45.

Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Crestani, M.; Fonseca, M.B.; Pedron, F.A.; Duarte, M.F.; Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotox. Environ. Saf.** 65, 237–241.

Heath, A.G., 1995. **Water Pollution and Fish Physiology**, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.** Wiley-Liss, Hoboken. pp. 319-368.

Hinton, E.H.; Segner, H.; Au, D.W.T.; Kullman, S.W.; Hardman, R.C., 2008. Liver Toxicity, In: Di Giulio, R.T.; Hinton, (Ed.), **The Toxicology of Fish.** Taylor & Francis. pp 327 - 400.

Hopkins, J.; Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **Br. J. Haematol.** 25, 563-575.

Hussein, S.Y.; El-Nasser, M.A.; Ahmed, S.M., 1996. Comparative Studies on the Effects of Herbicide Atrazine on Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, **Egypt. Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 57, 503-510.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), 2010. **Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental.** Rebelo, R.F.; Vasconcelos, R.A.; Buys, B.D.M.C.; Rezende, J.A.; Moraes, K. O.C.; Oliveira, R.P. Brasília. Ibama.

Keen, J.H.; Habig, W.H.; Jakoby, W.B., 1976 .Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **J. Biol. Chem.** 20, 6183-6188.

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.** 147 C, 222–231.

Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 120 A, 43-49.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randal, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275.

Mayer , F.L.; Versteeg, D.J.; Mckee, M.J.; Folmar, L.C.; Graney, R.L.; Mccume, D.C.; Rattner B.A., 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrie Jr, P.M.;Bergman, H. L. (Eds). **Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers. pp 211- 334.

Min, E.Y.; Kang, J.C., 2008. Effect of waterborne beromyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Pestic. Biochem. Physiol.** 92, 138-143.

Miron, D.S.; Pretto, A.; Crestani, M.; Gluszczak, L.; Schetinger, M.R.; Loro, V.L.; Morsch, V.M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**.74, 1-5.

Miron, D.S.; Shetinger, M.R.; Morsch, V.M.; Baldisseroto, B.; Tierno, M.A.; Moraes, G; Vieira, V.L. P., 2005. Effects of herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelem*) (Heptapteridae). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 61, 398-403.

Modesto, K.A.; Martinez, C.B. R., 2010 a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**. 81, 781-787.

Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R., 2010 b. Roundap® cause oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**. 78, 294-299.

Moraes, B.S.; Loro, V.L.; Gluszczak, L.; Pretto, A.; Menezes, C.; Marchezan, E.; Machado, S.O., 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters, of teleost fish (*Leporinus otusidens*). **Chemosphere**. 68, 1597-1601.

Monteiro, D.A.; Almeida, J.A.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp. Biochem. Physiol.** 143 C, 141-149.

Oruç, E.Ö.; Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 23, 48-55.

Payne, J.F.; Mathieu, A.; Melvin, W.; Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association whit two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Mar. Poll. Bull.** 32, 225-231.

Pereira Maduenho, L.; Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 148 C, 265–272.

Primel, E.G., 2005. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição teórica e monitoramento. **Quím. Nova.** 28, 605-609.

Rahimi, R., Abdollahi, M., 2007. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. **Pestic. Biochem. Physiol.** 88, 115–121.

Rand, G.M., 1995. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**, 2nd ed. Washington: Taylor & Francis.

Rand, G.M.; Petrocelli, S.R., 1985. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation.

Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Orti, G., 2001. Populations structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Mol. Ecol.** 10, 407-417.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola a), 2009. http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1399. Acesso em 01/2010.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola b), 2009. <http://www.sindag.com.br/upload/OSetordeDefensivosagricolasnoBrasil.doc>. Acesso em 04/2010.

Stegeman, J.J.; Brouwer, M.; Di Giulio, R.T.; Förlin, L.; Fowler, B.A.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle Jr, P.M.; Bergman, H.L. (eds.) **Biomarkers**. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Boca Raton, Lewis Publishers, pp 235-335.

Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29, 1715-1733.

Syakalima, M.; Choongo, K.; Mwenechanya, R.; Wepener, V.; Yamasaki, M.; Maede, Y., 2006. Pesticide/Herbicide pollutants in Kafue river and a preliminary investigation into their biological effect their biological effect through catalase levels in fish. **Jpn. J. Vet. Res.** 54, 119-128.

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.

Winkaler, E.U.; Santos, T.R.M.; Machado-Neto, J.G.; Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 145 C, 236–244.

4. PARTE II - ALTERAÇÕES EM PARÂMETROS FUNCIONAIS DO PEIXE *Prochilodus lineatus* INDUZIDAS PELO PRINCÍPIO ATIVO AMETRINA E PELO SEU PRODUTO GESAPAX® 500^a

Lindalva Pereira^{b,c}

Marisa N. Fernandes^{d,c}

Cláudia B. R. Martinez^{b*}

RESUMO

Os peixes, assim como os outros organismos aquáticos, são afetados pela contaminação por agrotóxicos provenientes de aplicações nas lavouras. Para avaliar os efeitos do herbicida ametrina foram selecionados alguns biomarcadores, como os parâmetros hematológicos, metabólico, osmo-iônicos, bioquímicos e genotóxicos do peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Exemplares jovens de *P. lineatus* foram expostos ao herbicida ametrina e ao produto formulado à base de ametrina, o Gesapax® 500, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ por 96 h. Esses peixes apresentaram redução do hematócrito (Hcto) nas duas concentrações testadas e do número de eritrócitos (RBC) na concentração de 5,0 mg.L⁻¹ de ambos os produtos. Os resultados hematológicos sugerem rompimento de eritrócitos, que é reforçado pelo aumento do K⁺ plasmático em 2,5 mg.L⁻¹, tanto para a ametrina quanto para o Gesapax® 500. Os peixes também apresentaram aumento da glicemia em ambas as concentrações dos produtos, indicando provável resposta de estresse. A atividade branquial da enzima Na⁺/K⁺ATPase foi reduzida na maior concentração, embora as concentrações de Na⁺ e K⁺ não tenham se mostrado alteradas. Os níveis de malondialdeído tiveram diminuição significativa na concentração de 5,0 mg.L⁻¹, indicando que os produtos testados não causaram peroxidação lipídica. Porém, os resultados do teste do cometa indicaram aumento de danos no DNA de eritrócitos

^a **Nota:** Manuscrito em fase de preparação a ser submetido para publicação no periódico Chemosphere.

^b ^aDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, Km 374, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná – Brasil.

^c ^cPrograma de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais- Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luis, Km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo – Brasil.

^d ^bDepartamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luis, Km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo – Brasil.

dos peixes na concentração de $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ambos os produtos indicando que a ametrina é genotóxica para *P. lineatus*. Os resultados indicam que a ametrina e o Gesapax[®] 500 apresentam os mesmos efeitos, e podem causar danos à saúde de *P. lineatus*, nas condições a que estes foram expostos.

Palavras-chave: Herbicida, danos no DNA, Na^+/K^+ -ATPase branquial, resposta de estresse.

4.1. INTRODUÇÃO

A ametrina (2-etilamino)-4-(isopropilamino)-6-(metiltio)-s-triazina, é um herbicida do grupo das triazinas que vem sendo muito utilizado nas lavouras. É um inibidor da fotossíntese, por interferir no transporte de elétrons do fotossistema II (DUKE, 1990). Este herbicida apresenta classificação toxicológica III, sendo considerado moderadamente tóxico (EPA, 2005). Os resíduos de ametrina encontrados em águas superficiais têm sido da ordem de $0,05$ a $1,4 \mu\text{L}^{-1}$ (BOCQUENÉ & FRANCO, 2005; JACOMINI *et al.*, 2011). Por ser considerada pouco solúvel em água (200 mg.L^{-1} - RODRIGUES & ALMEIDA, 2011) a ametrina tem potencial para se acumular nos sedimentos e na biota aquática USGS (2010). Devido a sua resistência à hidrólise, sua principal via de degradação é o metabolismo aeróbico onde forma metabólitos considerados tóxicos como 2-amino-4-isopropilamino-6-metiltio-s-triazina e 2-etilamino-4-amino-6-metiltio-s-triazina, que podem atingir as águas por escoamento superficial ou por infiltração (EPA, 2005).

Para peixes de água doce a ametrina é considerada ligeira ou moderadamente tóxica. Em espécies de regiões temperadas, este herbicida apresentou toxicidade moderada para *Cyprinodon variegatus* ($\text{CL}_{50} 96\text{h} - 3,6 \text{ mg.L}^{-1}$) e toxicidade baixa para *Oncorhynchus mykiss* ($\text{CL}_{50} 96\text{h} - 16 \text{ mg.L}^{-1}$) (EPA, 2005). Os metabólitos formados a partir da degradação da ametrina se mostraram tóxicos para a bactéria *Vibrio fischeri*, sendo medida pela diminuição da bioluminescência apresentada pela espécie (FARRÉ *et al.*, 2002).

O peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (Ordem Characiformes) é uma das espécies nativas mais abundantes dos rios da América do Sul

(SIVASUNDAR *et al.*, 2001) e tem se destacado comercialmente pelo seu potencial para a pesca, alta produtividade e fácil criação em pisciculturas (WINKALER *et al.*, 2007). Por ser considerada vulnerável a alterações ambientais (STASSEN *et al.*, 2010), esta espécie tem sido muito utilizada *in situ* para avaliar a qualidade de ambientes impactados (ALMEIDA *et al.*, 2005; CAMARGO & MARTINEZ, 2006; CAZENAVE *et al.*, 2009) e em testes de toxicidade com diferentes contaminantes como agrotóxicos, metais e derivados de petróleo (CARVALHO & FERNANDES, 2008; PEREIRA MADUENHO & MARTINEZ, 2008; SIMONATO *et al.*, 2008; CAMARGO *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010 a, b; PAULINO *et al.*, 2012). Além disso, *P. lineatus* tem hábito detritívoro, podendo ser contaminado também pela via digestiva, o que torna esta espécie potencialmente suscetível à contaminação por agrotóxico com capacidade de se acumular no sedimento. Portanto, esta espécie tem potencial para ser usado no biomonitoramento de áreas impactadas.

As alterações biológicas decorrentes de exposição a contaminantes são conhecidas como biomarcadores. Parâmetros hematológicos, metabólicos, osmo-iônicos, bioquímicos e genéticos são considerados bons biomarcadores e permitem avaliar a saúde do organismo, além de alertar sobre possíveis riscos ambientais (MAYER *et al.*, 1992; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

O sangue é responsável pela homeostase do organismo, pois desempenha importantes funções tais como o transporte de gases, nutrientes, hormônios, metabólitos entre outros. Análise de parâmetros hematológicos como hematócrito (Hcto), hemoglobina (Hb) e número de eritrócitos (RBC) é importante na avaliação da saúde dos peixes, pois podem refletir as condições do ambiente (BARCELLOS *et al.*, 2003; DE PEDRO *et al.*, 2005). A glicemia reflete as condições de estresse em que o organismo se encontra, pois a demanda energética envolvida no mecanismo de adaptação ao agente estressor induz o aumento da glicose plasmática, necessário para o restabelecimento da homeostase (WENDELAAR BONGA, 1997; VAL *et al.*, 2004; IWAMA *et al.*, 2006). Assim, mudanças no metabolismo de carboidratos podem ser utilizadas como indicadores de estresse em peixes (WENDELAAR BONGA, 1997).

Os compostos tóxicos presentes na água podem afetar o epitélio branquial, refletindo na tomada de íons e no balanço hídrico (WENDELLAR BONGA, 1997; DE LA TORRE *et al.*, 2007). Concentrações de íons como o sódio, potássio e cloreto, assim como a osmolaridade, podem ser parâmetros indicativos de alterações no processo de hiperregulação em peixes de água doce, causadas pela presença de contaminantes (WANG & YIN, 1997). Para compensar o influxo constante de água e as perdas iônicas decorrentes do gradiente osmótico entre o organismo e o meio, os peixes dulcícolas fazem tomada ativa de íons pelas brânquias, e as principais células transportadoras de íons em teleósteos são as células cloreto (STAGG *et al.*, 1992; WENDELAAR BONGA, 1997; HIROSE *et al.*, 2003; HWANG & LEE, 2007). A Na^+/K^+ ATPase (NKA) presente na membrana basolateral das células cloreto é uma das enzimas importantes na tomada de íons, pois regula a concentração intracelular de Na^+ e K^+ e gera um gradiente eletroquímico para a absorção de Na^+ e Cl^- , além de prover energia necessária para outros sistemas de transportes (GONZALEZ *et al.*, 2006; LINGWOOD *et al.*, 2006; HWANG & LEE, 2007). Os poluentes presentes no ambiente aquático podem interferir direta ou indiretamente na atividade da NKA (LAPIVAARA *et al.*, 2002; PARVEZ *et al.*, 2006; DE LA TORRE *et al.*, 2007). A anidrase carbônica (AC) é uma enzima que atua na regulação do equilíbrio ácido-básico, pois catalisa a hidratação do CO_2 e a formação de H_2CO_3 que se dissocia em HCO_3^- e H^+ . Nos peixes, esses íons são trocados por Cl^- e Na^+ nas brânquias, portanto, a interferência na atividade da AC pode afetar a tomada de Cl^- e Na^+ e a excreção de H^+ (CHEW *et al.*, 2006; GILMOUR e PERRY, 2009; PAULINO *et al.*; 2012). Alterações na atividade da NKA e da AC são consideradas potenciais biomarcadores de contaminação ambiental.

Os biomarcadores bioquímicos servem como sinais de alerta precoce sobre a presença de agentes tóxicos no ambiente, podendo ser utilizados tanto para caracterizar os efeitos biológicos de exposição, quanto para determinar a biodisponibilidade de contaminantes nos sistemas aquáticos (SCHREIBER *et al.*, 2006). Em peixes, as enzimas da subfamília CYP1A do complexo citocromo P450 atuam na fase I do processo de biotransformação de uma ampla variedade de xenobióticos (MOORE *et al.*, 2003). A indução desta enzima por contaminantes pode ser avaliada por meio da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD). A enzima glutationa-S-transferase (GST) atua na fase II do processo de

desintoxicação, conjugando os produtos resultantes da fase I com compostos endógenos como o tripeptídeo glutationa (GSH), para que sejam eliminados, reduzindo a probabilidade desses agentes tóxicos se ligarem a outras macromoléculas celulares causando danos (STEGEMAN *et al.*, 1992; FERRARI *et al.*, 2007).

As reações de oxidação e redução que ocorrem durante o processo de desintoxicação geram espécies reativas de oxigênio (ERO) como o ânion radical superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$). Por serem altamente reativas, estas ERO podem causar danos oxidativos em moléculas importantes para a constituição e funções celulares, como os lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (HERMES-LIMA, 2004; WILHELM FILHO, 2007; LUSHCHAK, 2011). Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) fazem parte do sistema antioxidante da célula e atuam removendo essas ERO (VAN DER OOST *et al.*, 2003; HERMES-LIMA, 2004). A célula também conta com compostos não enzimáticos como o tripeptídeo glutationa reduzida (GSH) como antioxidante, pois além de agir diretamente sobre as ERO, este participa de reações catalisadas pela GST e como cofator para GPx. Estudos com peixes expostos a diferentes agrotóxicos evidenciam alterações nas enzimas de biotransformação e componentes antioxidantes da célula (ORUÇ & USTA, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2006; MIKULA *et al.*, 2009; MODESTO & MARTINEZ, 2010 a), indicando que esses parâmetros podem ser utilizados como biomarcadores.

A peroxidação lipídica é uma das consequências do desbalanço oxidativo causado pelo aumento de ERO, sendo considerada a maior causa de injúria e morte celular (HERMES-LIMA, 2004). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da peroxidação lipídica e pode ser determinado através da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que pode ser uma ferramenta útil para avaliar a lipoperoxidação (RAEL *et al.*, 2004).

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina das vias colinérgicas, importante para o desempenho de atividades necessárias a sobrevivência no ambiente aquático como orientação, localização e busca por alimento, fuga de predadores e reprodução (DUTTA & ARENDS, 2003). A AChE é considerado um antigo biomarcador para

organofosforados e carbamatos que são inibidores clássicos dessa enzima (BRETAUD *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002; DUTTA e AREND, 2003; CHANDRASEKARA & PATHIRATNE, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2006). Entretanto, outros agrotóxicos também têm mostrado efeito anticolinesterásico em peixes, afetando o processo de transmissão colinérgica, como o glifosato para *P. lineatus* e *Leporinus obtusidens* (GLUSCZAK *et al.*, 2006; MODESTO & MARTINEZ, 2010 b), o clomazone para *L. obtusidens* e *Rhamdia quelen* (MIRON *et al.*, 2005; MIRON *et al.*, 2008) e o herbicida 2, 4 diclorofenoxiacético (2,4 D) para *R. quelen* (CATTANEO *et al.*, 2008). A estimulação excessiva dos nervos colinérgicos e fibras musculares pela acetilcolina causada pela inativação da AChE pode alterar o comportamento e as funções musculares do animal (FERRARI *et al.*, 2007). Devido a importância da atividade da AChE no organismo, esta enzima tem grande potencial para ser utilizada como biomarcador em testes de toxicidade e monitoramento de áreas agrícolas.

Muitos agentes químicos são considerados genotóxicos por induzirem alterações na molécula de DNA, que causam sua fragmentação (VAN DER OOST *et al.*, 2003; HERMES-LIMA, 2004). Essas alterações podem ocorrer de forma direta, quando a substância tóxica liga-se à molécula de DNA formando adutos, ou de forma indireta, por danos oxidativos (HERMES-LIMA, 2004; FRANCO *et al.*, 2009). O ensaio do cometa tem demonstrado boa aplicabilidade e por ser uma técnica rápida e sensível, tem sido muito utilizada para quantificar os danos no DNA em organismos aquáticos submetidos a teste de toxicidade (LEE & STEINERT, 2003; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

As aplicações de ametrina nas lavouras ocorrem através do uso de formulações comerciais como o Gesapax[®] 500. Muitas vezes as formulações dos agrotóxicos são mais tóxicas do que o princípio ativo, como é o caso do herbicida a base de glifosato, o Roundup[®], para o qual a maior toxicidade é atribuída ao surfactante usado na formulação, o polioxiaminoetileno (POEA) (COX, 1998; COX & SURGAN, 2006). Estudos sobre os efeitos da ametrina em peixes neotropicais são de grande relevância, pois os poucos dados sobre a toxicidade deste herbicida estão restritos a CL₅₀ para espécies de peixes de regiões temperadas.

Nesse contexto, este estudo foi desenhado para avaliar a toxicidade do herbicida ametrina e seu produto formulado, o Gesapax[®] 500 para o peixe neotropical *P. lineatus*, por meio da análise integrada de alguns parâmetros hematológicos, metabólicos, osmo-iônicos, bioquímicos e genético.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Organismos Teste

Peixes jovens da espécie *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) com peso médio de $15,80 \pm 2,39$ g e comprimento total médio de $11,51 \pm 0,71$ cm (média \pm DP) foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Os peixes foram aclimatados por sete dias em tanques de 300 L, contendo água desclorada com aeração constante com as seguintes características físicas e químicas (média \pm DP): temperatura $25,05 \pm 0,60$ °C; pH $7,35 \pm 0,30$; oxigênio dissolvido $6,66 \pm 1,01$ mg O₂. L⁻¹; condutividade $73,43 \pm 12,90$ μ S.cm⁻¹. Durante a aclimação os animais foram alimentados com ração comercial (36% de proteína - Guabi[®], BR) em intervalos de 48 horas, que foi suspensa 24 h antes do início e durante os testes.

4.2.2. Testes de Toxicidade

Para os testes de toxicidade foram usadas duas concentrações (2,5 e 5,0 mg.L⁻¹) de ametrina (Ametryn PESTANAL[®] Sigma-Aldrich) e do produto formulado a base de ametrina, o Gesapax[®] 500 (Ciba Geigy Syngenta). A ametrina foi diluída em água após ter sido dissolvida em metanol. Após aclimação, os peixes foram transferidos para aquários de vidro de 80 L (n = 8 por aquário). Para cada concentração havia um grupo controle (CTR), com peixes expostos apenas a água, e dois grupos experimentais: um contendo ametrina e o outro contendo o produto formulado Gesapax[®] 500, em teste estático de 96 h. Devido a ausência de dados sobre a toxicidade da ametrina para peixes de regiões neotropicais, a concentração utilizada neste estudo foi baseada na menor concentração (5 mg.L⁻¹) utilizada por Lombardi *et al.* (2001) em estudo com camarão de água doce da

espécie *Macrobrachium rosenbergii*. E a concentração de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$, correspondendo a 50% da anterior. Essas concentrações estão abaixo CL_{50} para a espécie de peixe de clima temperado *Oncorhynchus mykiss* que foi de 16 mg.L^{-1} (EPA, 2005). Durante os testes os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados diariamente (média \pm DP): temperatura $24,5 \pm 0,27 \text{ }^\circ\text{C}$, pH $7,03 \pm 0,28$, OD $6,93 \pm 0,24 \text{ mg O}_2. \text{ L}^{-1}$ e condutividade $67 \pm 1,80 \text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$.

4.2.3. Amostragem

Os procedimentos adotados na amostragem foram aprovados pelo Comitê de Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina. Após a exposição de 96 h os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) e o sangue foi retirado pela veia caudal com seringas heparinizadas. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para a retirada dos órgãos: brânquia, fígado, músculo e cérebro, que foram armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento das análises. O sangue foi centrifugado (10 min, 10.000 g) e as amostras de plasma foram congeladas a -20°C para posterior determinação da glicemia, osmolaridade e concentrações iônicas.

4.2.4. Análises Hematológicas

O Hcto (%) foi determinado pela técnica do microhematócrito em capilares heparinizados e centrífuga apropriada. A concentração de Hb (g.L^{-1}) foi estimado pelo método da cianometahemoglobina (kit comercial Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro em 540 nm. Para a determinação do RBC (n° eritrócitos por mm^3 de sangue) amostras de sangue foram diluídas em tampão formol-citrato (citrato de sódio diluído em 0,4% de formol em solução) e a contagem das células feita em câmara de Neubauer no microscópio de luz (400 x).

4.2.5. Análise da Glicemia

A concentração de glicose plasmática (mmol.L^{-1}) foi determinada pelo método da glicose oxidase (kit comercial Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro em 505 nm.

4.2.6. Análises Plasmáticas da Osmolaridade e Concentrações Iônicas (Na^+ , K^+ e Cl^-)

A osmolaridade plasmática (mOsm.L^{-1}) foi medida por congelamento usando micro-osmômetro. Para as medidas das concentrações de Na^+ e K^+ plasmáticos (mmol.L^{-1}), as amostras foram diluídas em água deionizada e analisadas em fotômetro de chama. A concentração plasmática do Cl^- (mmol.L^{-1}) foi determinada pelo método do tiocianato de mercúrio (kit comercial Labtest, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas em 470 nm.

4.2.7. Atividade Branquial das Enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (NKA) e Anidrase Carbônica (AC)

Para a medida da atividade da NKA ($\mu\text{MPi.mg prote\u00edna}^{-1}.\text{h}^{-1}$) o tecido branquial foi pesado e homogeneizado (10% p/v) em solução SEI (Sacarose 300 mM, Na_2EDTA 0,1 mM, Imidazol 30 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, pH 7,4) e centrifugado (7.500 g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi utilizado para as análises segundo protocolo estabelecido por Quabius *et al.* (1997), e adaptado por Nolan (2000) para leitora de microplacas. O método baseia-se na produção de fosfato inorgânico em amostras incubadas com tampão (NaCl, MgCl_2 , imidazol, EDTA, ATP, pH 7,6) contendo KCl (5 mM) ou ouabaína (2.5 mM), tendo como padrão uma solução de fosfato 0,65 mM (Sigma). A leitura foi feita em leitora de microplacas em 620 nm.

Para a determinação da atividade da AC os filamentos branquiais foram homogeneizados (10% p/v) em meio de reação (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, TRIS, NaH_2PO_4 , pH 7,4), centrifugados (7.500 g, 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi separado para as análises. A atividade da AC ($\text{AC.g prote\u00edna}^{-1}$) foi determinada pelo método estabelecido por Vitale *et al.* (1999), que se baseia na catálise de uma

solução saturada de CO₂ com correspondente liberação de H⁺. A redução do pH foi monitorada por 20 s, em medidor de pH.

4.2.8. Enzimas de Biotransformação e Antioxidantes no Fígado

O tecido hepático foi pesado, homogeneizado (10% p/v) em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), centrifugado (20 min, 14.700 g, 4°C) e o sobrenadante separado para as análises. A atividade da CPY1A foi determinada pela análise da atividade da EROD (pmol de resorufina.min⁻¹.mg de proteína⁻¹), por método fluorimétrico em microplaca, adaptado de Eggens e Galgani (1992), que se baseia na conversão da 7-etoxioresorufina em resorufina. O aumento progressivo da fluorescência foi observado a 530 nm. A atividade da GST (nmol CDNB conjugado. min⁻¹.mg de proteína⁻¹) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Keen *et al.* (1976), que consiste na complexação de GSH com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), determinada a 340 nm.

A atividade CuZn-SOD (U SOD. min⁻¹.mg de proteína⁻¹) foi determinada pela taxa de inibição da redução do citocromo C pelo O₂^{-•}, devido à presença da enzima (McCord e Fridovich, 1969), em 550 nm. A atividade da CAT (μmol H₂O₂ metabolizado. min⁻¹.mg de proteína⁻¹) foi determinada pela quantificação da velocidade de decomposição do H₂O₂ a O₂ e H₂O pela enzima, através do decréscimo de absorvância a 240nm, conforme Beutler (1975). A GPx teve sua atividade (μmol NADPH oxidado. min⁻¹.mg de proteína⁻¹) determinada pela técnica descrita por Hopkins e Tudhope (1973), baseada na medida do decréscimo de absorvância promovido durante a oxidação do NADPH em presença de peróxido, em 340 nm. O conteúdo de GSH (μg de GSH. min⁻¹.mg de proteína⁻¹) foi determinado conforme o método descrito por Beutler *et al.* (1963), baseado na reação do ácido 5,5'-ditiobis 2- nitrobenzóico (DTNB) com a glutathione, gerando o ânion tiolato (TNB) de cor amarela, a 412 nm.

4.2.9. Peroxidação Lipídica no Fígado

A determinação da peroxidação lipídica (μmol de MDA.mg de proteína⁻¹) foi realizada por meio do ensaio TBARS (Federici *et al.*, 2007), que quantifica o MDA, um dos produtos finais da peroxidação lipídica. Este ensaio mede as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Alíquotas de sobrenadante do homogeneizado do tecido hepático preparado como descrito para enzimas de biotransformação e antioxidantes, foram misturadas a reagentes (BHT em etanol 95%, TBA em NaOH 0,3%, PBS pH 7,4, TCA 50%) e solução padrão de MDA 0,3 mM em microplaca e mantidas a 60 °C por 1 h. A leitura (fluorescência) foi feita a 530 nm.

4.2.10. Acetilcolinesterase em Cérebro e Músculo

Amostras de tecido cerebral e muscular foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,5) (10% p/v) e centrifugadas (10.000 g, 20 min, 4 °C) para a determinação da atividade da AChE, de acordo com o método de Ellman *et al.* (1961), adaptado para microplaca por Alves Costa *et al.* (2007). A determinação da atividade da AChE (nmol DTNB min⁻¹ mg de proteína⁻¹) ocorreu a partir da reação do substrato de iodeto de acetiltiocolina (9 mM) com o reagente de cor DTNB (0.5 mM), a 415 nm.

4.2.11. Concentração de Proteínas

A concentração de proteínas (mg.L⁻¹) para todos os homogeneizados foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951) em espectrofotômetro a 700 nm.

4.2.12. Análise de Danos Genotóxicos no DNA – Ensaio do Cometa

O ensaio alcalino do cometa foi realizado de acordo com Singh *et al.* (1988) com algumas modificações (VANZELLA *et al.*, 2007). Alíquotas de suspensão contendo células sanguíneas em solução salina (PBS: NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM,

CaCl 1,5 mM, NaHCO₃ 3,7 mM, Na₂HPO₄ 8,9 mM, NaH₂PO₄ 2,9 mM), foram adicionadas à agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (100 mg em 20 mL PBS) a 37 °C. Após, a mistura foi distribuída em lâminas previamente recobertas com agarose normal 1,5% (300 mg para 20 mL PBS), cobertas com lamínulas e refrigeradas para solidificação. Após 30 min as lamínulas foram removidas e as lâminas colocadas em solução de lise (NaCl₂ 5 M; EDTA 100 mM; Tris 10mM; DMSO 10%, Triton X-100 1 mL, pH 10) por no mínimo 1 hora, sob refrigeração. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas durante 30 min em cubas de eletroforese envoltas por gelo em recipiente escuro, e cobertas com solução tampão (NaOH 0,3 N, EDTA 1 mM, pH > 13). Na sequência, as lâminas foram expostas a eletroforese (1 V.cm⁻¹, 300mA, 25 V) durante 20 min. Após, as lâmina foram recobertas com tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) com renovação completa do tampão a cada 5 min, durante 15 min. Depois de secas, as lâminas foram fixadas em etanol por 10 min e guardadas em geladeira.

Para as análises as lâminas foram coradas com gelRed (Uniscience) e examinadas ao microscópio de fluorescência (DM 2500), com filtro de excitação de 450-490 nm e um filtro de barreira de 590 nm, em objetiva de 40x. Foram analisados 100 nucleóides por animal e os danos no DNA foram classificados de acordo com Kobayashi *et al.* (1995), considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 (sem dano aparente); classe 1 (cauda curta menor que o diâmetro do núcleo); classe 2 (comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo); classe 3 (comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo). A partir dessa classificação foi calculado o escore de danos no DNA, somando os resultados obtidos pela multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe.

4.2.13. Análises Estatísticas

Os valores médios obtidos para cada variável analisada, para cada uma das concentrações experimentais da ametrina e do produto formulado Gesapax[®] 500, foram comparados entre si e com o respectivo grupo controle por meio de análise de variância paramétrica ANOVA, após teste de normalidade.

Quando indicado, as diferenças foram identificadas por meio de teste de comparação múltiplas (Student-Newman-Keuls). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Parâmetros Hematológicos

Após exposição de 96 h, o Hcto diminuiu significativamente nos peixes expostos à concentração de 2,5 ($P = 0,025$) e 5 mg.L^{-1} ($P = 0,002$) nos grupos experimentais ametrina e Gesapax[®] 500, em comparação com seus respectivos grupos CTR (Fig.4 A). O RBC apresentou diminuição significativa nos peixes expostos a concentração de 2,5 ($P = 0,022$) e 5 mg.L^{-1} ($P = 0,024$) de ambos os produtos, em comparação com seus respectivos grupos CTR (Fig.4 B). A concentração de hemoglobina permaneceu inalterada estatisticamente (Fig.4 C).

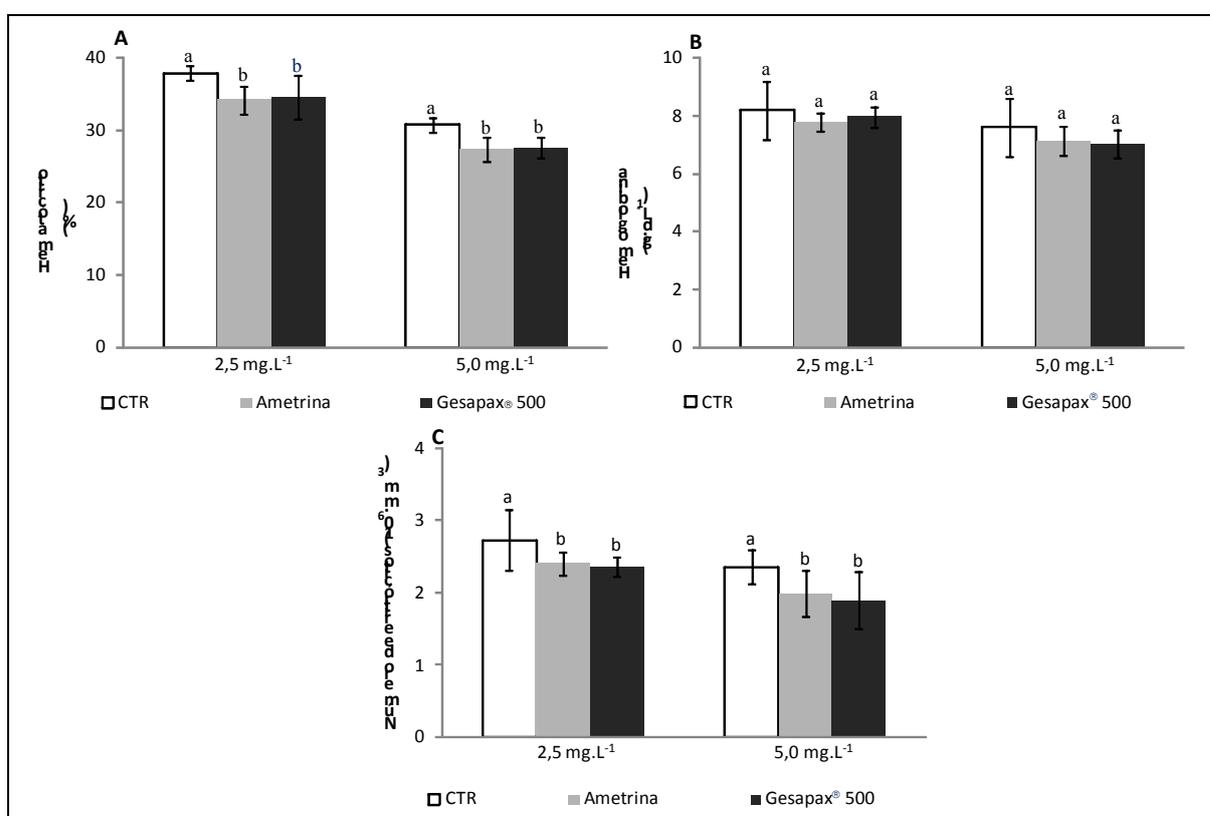


Figura 4. Valores médios e desvio padrão (n = 8) do hematócrito (A), hemoglobina (B) e número de eritrócitos (C) de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L^{-1} de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração ($P < 0,05$).

4.3.2. Parâmetro Metabólico

A glicose plasmática aumentou significativamente nos peixes expostos a 2,5 ($P = 0,001$) e 5 mg.L^{-1} ($P=0,002$) de ametrina e Gesapax[®]500, quando comparados aos peixes dos respectivos grupos CTR (Fig. 5).

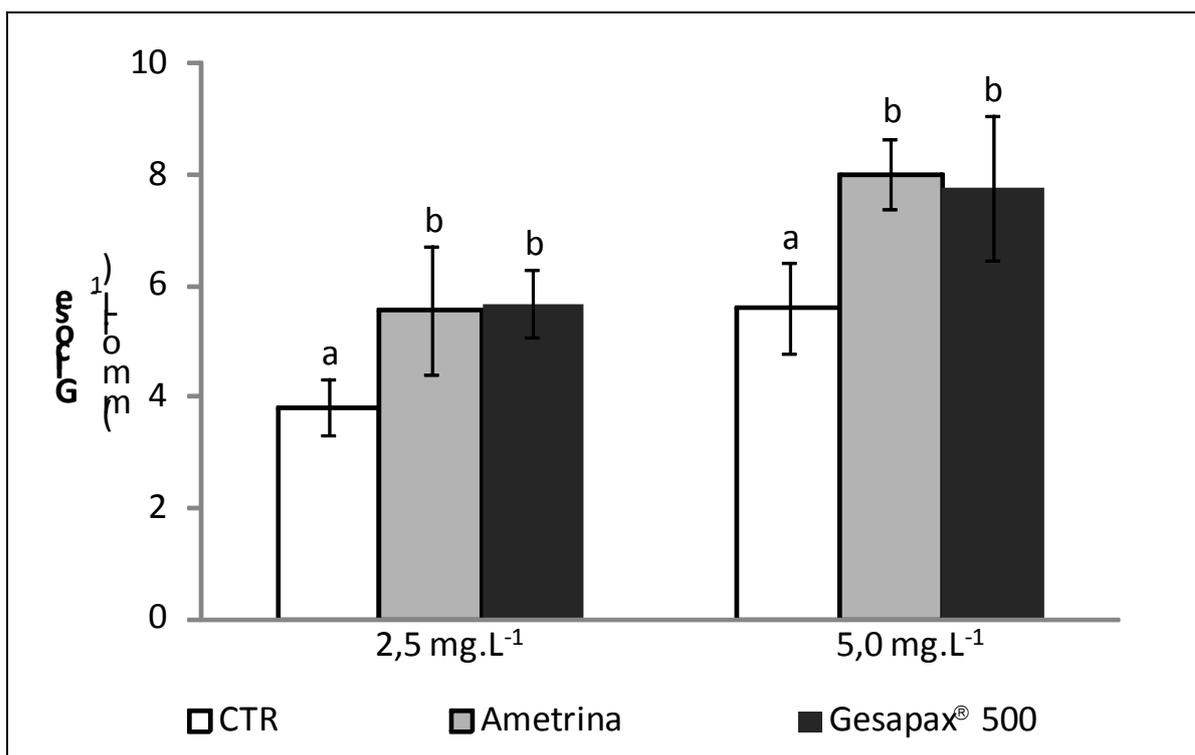


Figura 5. Valores médios e desvio padrão ($n = 8$) da concentração de glicose plasmática de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L^{-1} de ametrina e de Gesapax[®] 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração ($P < 0,05$).

4.3.3. Parâmetros Osmo-iônicos

Os peixes expostos a ametrina e ao Gesapax[®] 500 não apresentaram alterações significativas dos íons sódio e cloreto (Fig.6 A e B). O íon potássio apresentou aumento significativo apenas nos peixes expostos a concentração de 2,5 ($P = 0,006$) de ambos os produtos, quando comparado aos animais do grupo CTR (Fig.6 C). Não houve alteração estatisticamente significativa da osmolaridade (Fig.6 D).

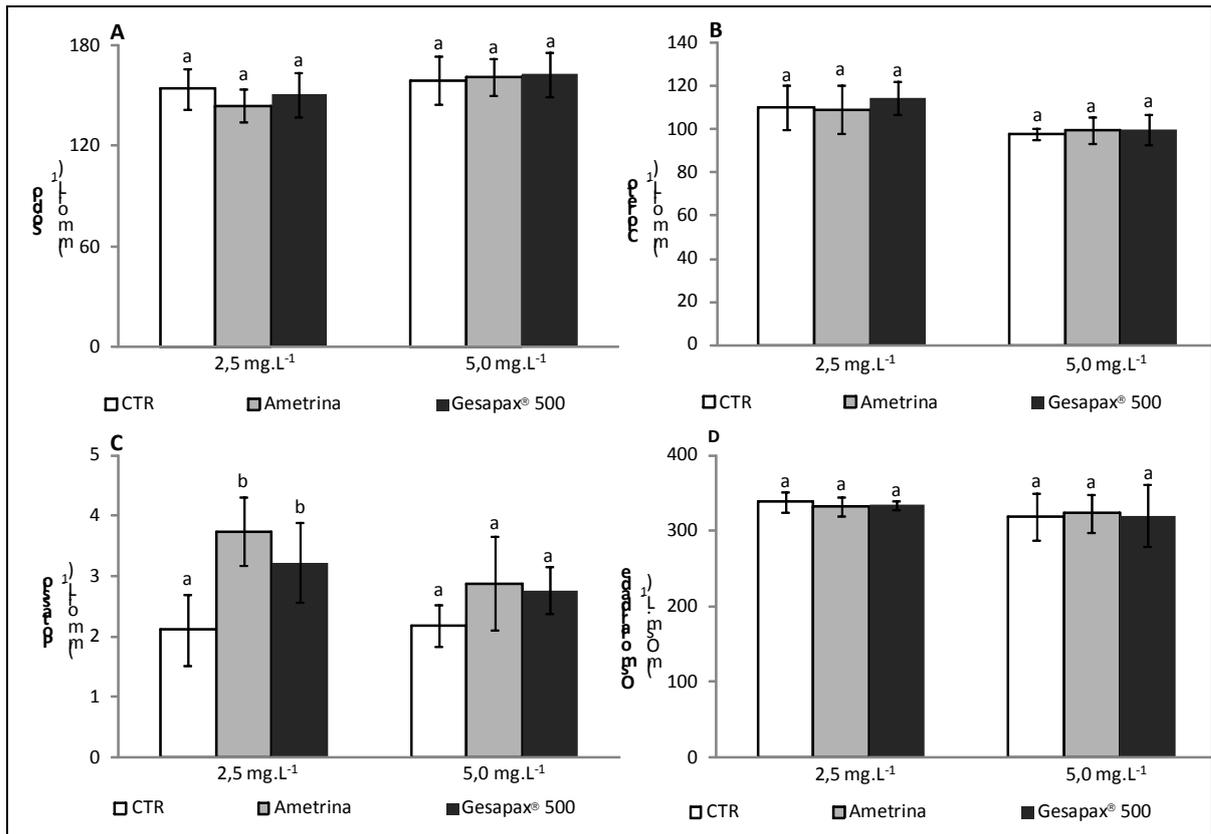


Figura 6. Valores médios e desvio padrão (n = 8) das concentrações plasmáticas de sódio (A), cloreto (B), potássio (C) e osmolaridade (D) de *P. Lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax® 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P < 0,05).

4.3.4. Parâmetros Bioquímicos

4.3.4.1. Atividade branquial das enzimas Na⁺/K⁺ ATPase e anidrase carbônica

A atividade da Na⁺/K⁺ATPase apresentou redução significativa nas brânquias dos peixes expostos somente à concentração 5 mg.L⁻¹ (P=0,002) tanto da ametrina quanto do Gesapax® 500, comparado com os animais dos grupos CTR (Fig. 7 A). A anidrase carbônica não teve sua atividade afetada significativamente pela ametrina ou pelo Gesapax® 500, em nenhuma das concentrações no tempo experimental de 96 h, em comparação com seus respectivos grupos CTR (Fig. 7 B).

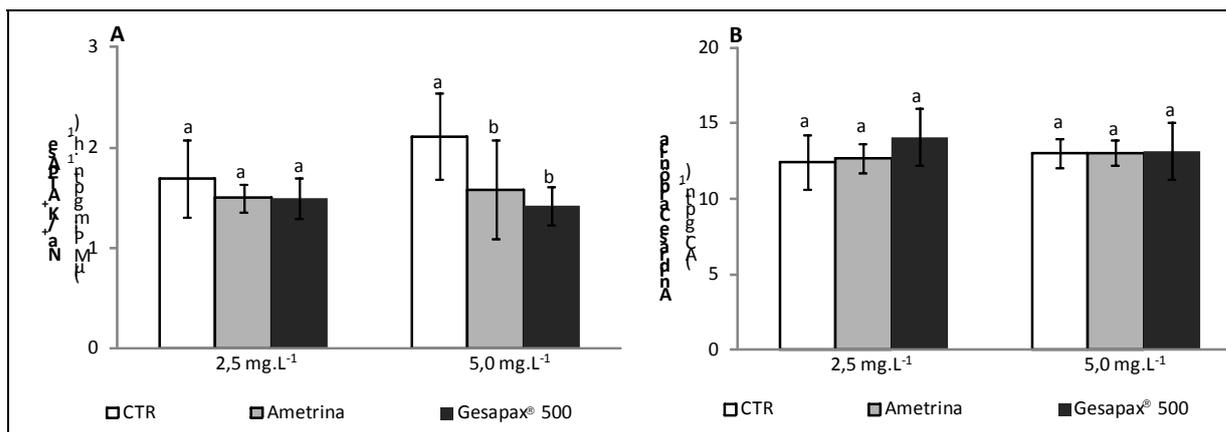


Figura 7. Valores médios e desvio padrão ($n = 8$) da atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (A) e anidrase carbônica (B) em brânquias de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L^{-1} de ametryn e de Gesapax® 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração ($P < 0,05$).

4.3.4.2. Atividade hepática das enzimas de biotransformação e defesas antioxidantes

Os animais expostos a ambas as concentrações de ametryn e Gesapax® 500 não apresentaram alterações significativas da EROD e GST, em comparação com os respectivos grupos CTR (Fig. 8 A e B). As enzimas SOD, CAT e GPx também não apresentaram alterações significativas nos peixes expostos a 2,5 e 5 mg.L^{-1} da ametryn e Gesapax® 500, em relação aos respectivos grupos CTR (Fig. 8 C, D e E). O conteúdo de GSH também não variou significativamente nos peixes expostos a concentração de 2,5 e 5 mg.L^{-1} de ametryn e Gesapax® 500 por 96 h, em comparação com os grupos CTR (Fig. 8 F).

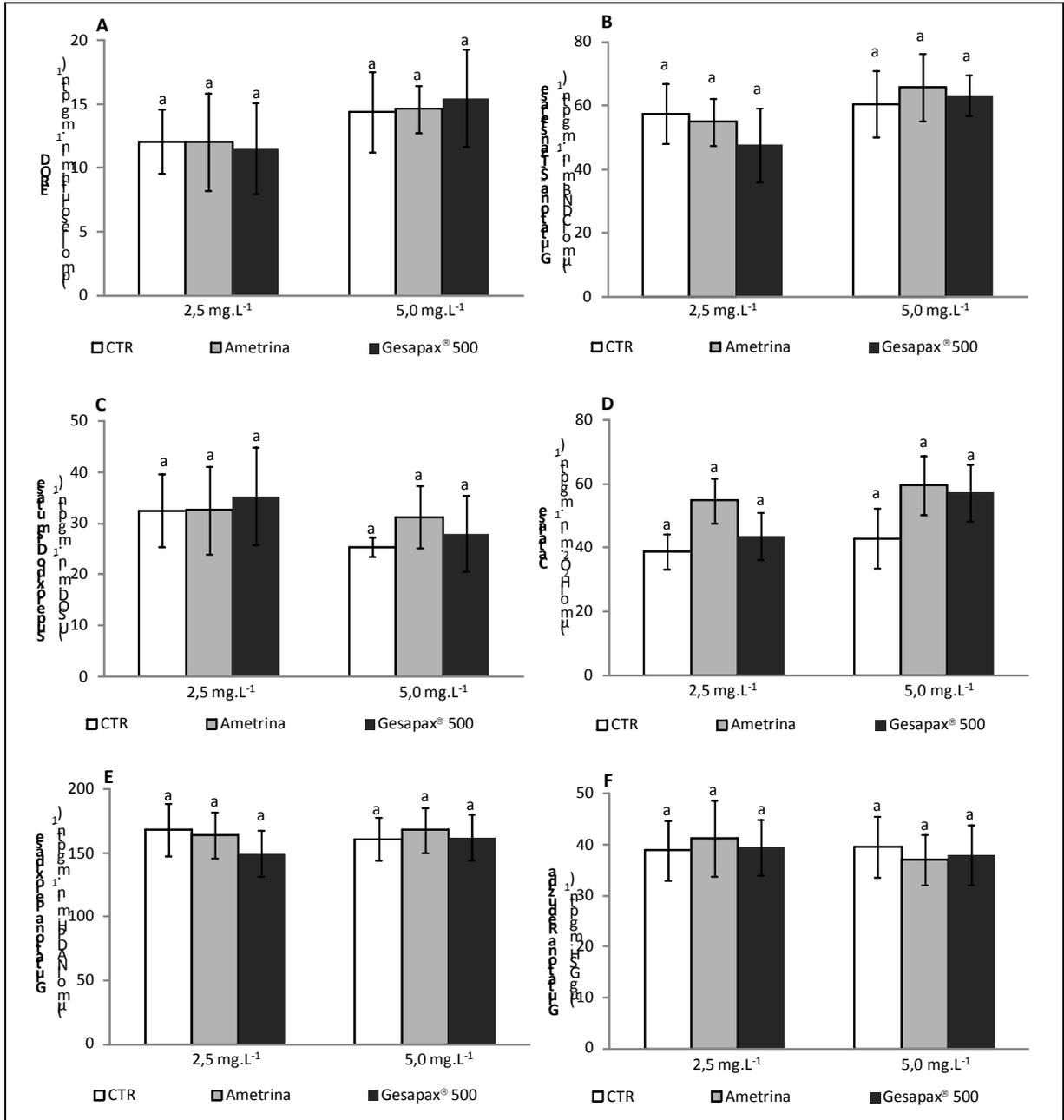


Figura 8. Valores médios e desvio padrão ($n = 8$) da atividade das enzimas etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) (A), GST (B), SOD (C), CAT (D), GPx (E) e conteúdo de GSH (F), em fígado de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax® 500, ou somente a água (CTR). Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração ($P < 0,05$).

4.3.4.3. Peroxidação lipídica

Os resultados mostraram que os peixes expostos à 5 mg.L⁻¹ de ametrina e Gesapax® 500 por 96 h apresentaram redução significativa no conteúdo hepático de MDA ($P = 0,007$), quando comparados aos respectivos grupos CTR, mas não houve diferenças estatisticamente significativas entre os produtos (Fig. 9).

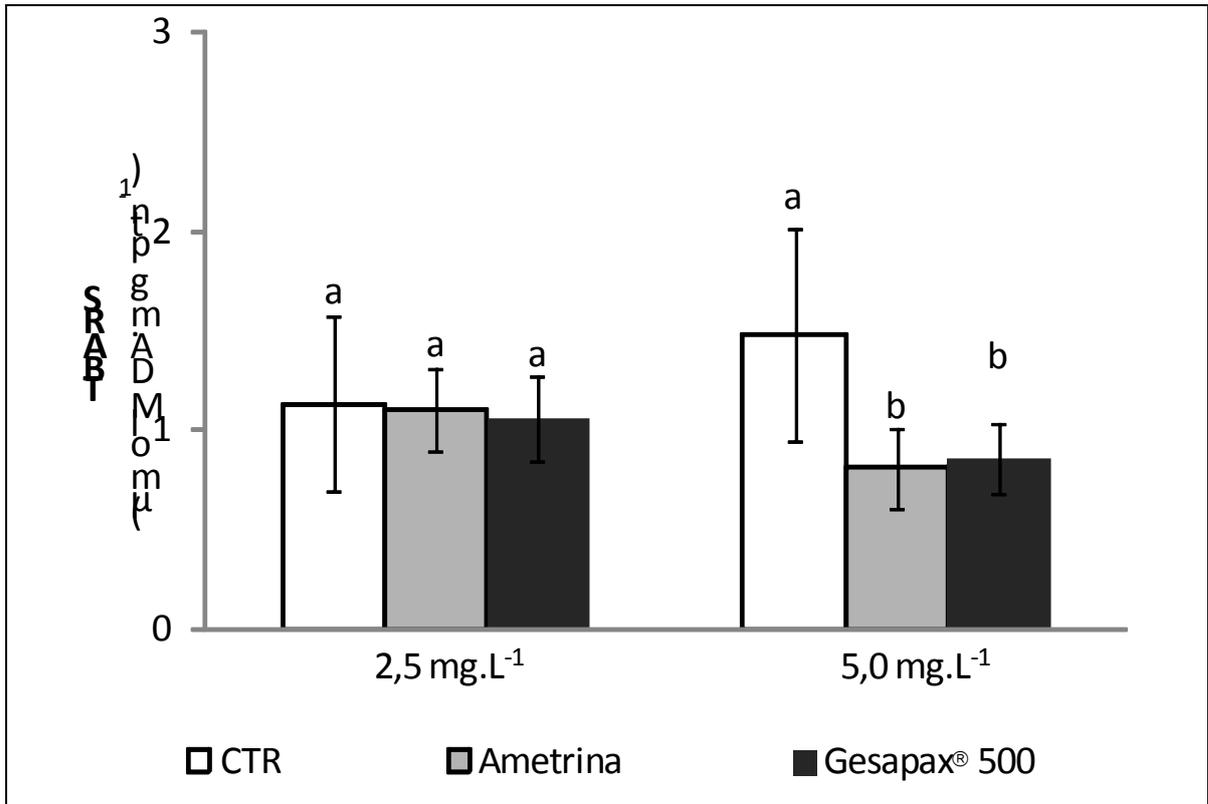


Figura 9. Valores médios e desvio padrão (n = 8) do conteúdo de MDA em fígado de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametryn e de Gesapax® 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P < 0,05).

4.3.4.4. Atividade da acetilcolinesterase

Não houve alterações significativas na atividade da enzima AChE cerebral e muscular nos peixes expostos às concentrações de 2,5 e 5 mg.L⁻¹ nos grupos experimentais ametryn e Gesapax® 500, em relação aos grupos CTR e entre os produtos testados (Fig. 10 A e B).

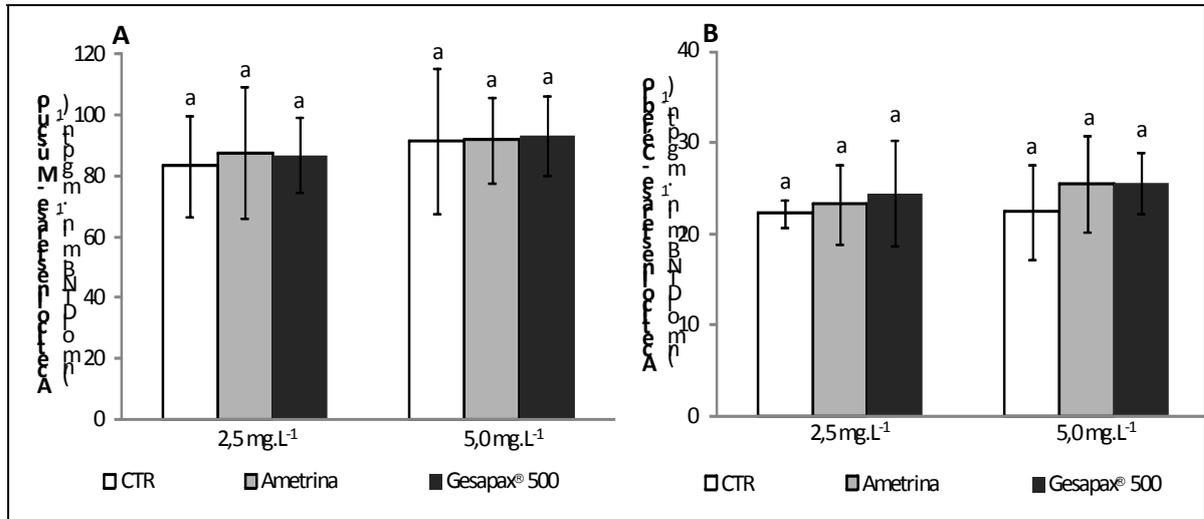


Figura 10. Valores médios e desvio padrão (n = 8) da atividade da AChE de cérebro (A) e músculo (B) de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametryn e de Gesapax® 500, ou somente a água (CTR). Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P < 0,05).

4.3.5. Parâmetro Genético

4.3.5.1. Danos no DNA – ensaio do cometa

Os peixes expostos a maior concentração (5 mg.L⁻¹) de ametryn e Gesapax® 500 apresentaram aumento significativo na ocorrência de danos no DNA dos eritrócitos quando comparados ao respectivo grupo CTR (Fig. 11).

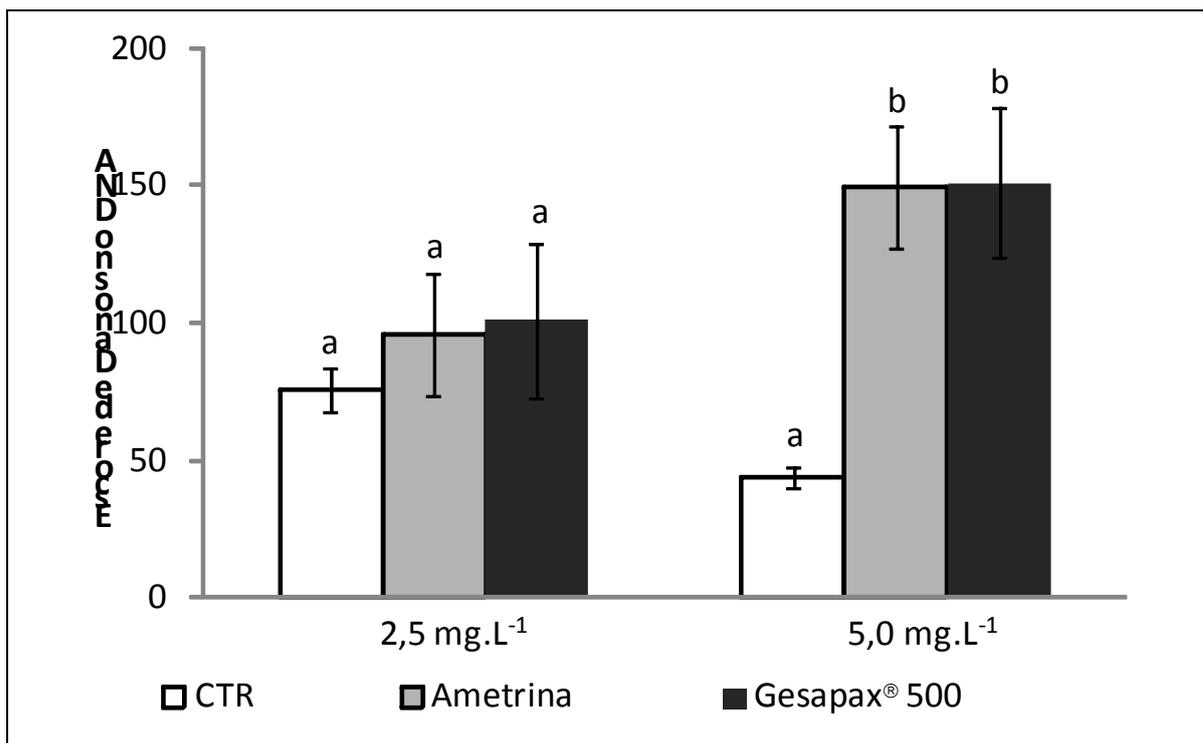


Figura 11. Escore médio (n = 8) de danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus* expostos por 96 h às concentrações de 2,5 e 5,0 mg.L⁻¹ de ametryn e de Gesapax® 500, ou somente a água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, para uma mesma concentração (P < 0,05).

4.4. DISCUSSÃO

Mudanças nos valores dos parâmetros sanguíneos são importantes indicadores de doenças e sinais de estresse em peixes (Tavares-Dias e Moraes, 2007). No presente estudo foi constatada diminuição significativa do Hcto e do RBC em *P. lineatus*, em ambas as concentrações testadas (2,5 e 5,0 mg.L⁻¹) de ametryn e do formulado Gesapax® 500. Não houve alteração significativa na concentração de Hb, embora os resultados mostrem tendência ao decréscimo. Alterações sanguíneas, como diminuição do Hcto, Hb e RBC foram observadas em tilápias (*Oreochromis niloticus*) e em bagres (*Chrysichthyes auratus*) expostos a outro herbicida triazínico, a atrazina, nas concentrações de 3 e 6 mg.L⁻¹ durante 14 e 28 dias (HUSSEIN *et al.*, 1996). A atrazina também provocou diminuição dos valores de RBC e concentração de Hb em carpas (*Cyprinus carpio*), em exposição de 24 a 185 mg.L⁻¹ (CL₅₀ - 24h). O metribuzin, do mesmo grupo das triazinas, causou diminuição do Hcto e Hb em *C. carpio* na concentração de 250,2 mg.L⁻¹ em 96 h de exposição (VELISEK *et al.*, 2011). Sabe-se que contaminantes ambientais podem causar

rompimento dos eritrócitos, resultando em diminuição do Hcto (WENDELAAR BONGA, 1997). Os resultados obtidos no presente estudo indicam perda de eritrócitos provavelmente por hemólise. Porém, nem sempre os mecanismos pelo qual agentes tóxicos causam danos às membranas dos eritrócitos que levam a remoção prematura destas células da corrente sanguínea, são esclarecidos (BLOOM & BRANDT, 2008). O que dá suporte à ideia de que tenha ocorrido rompimento das células sanguíneas, é o aumento plasmático do íon K^+ que será discutido posteriormente.

A disponibilização de energia faz parte de um conjunto de repostas secundárias de estresse, mediada pela ação de hormônios como as catecolaminas e o cortisol que induzem a glicogenólise e gliconeogênese, cuja finalidade é fazer com que o organismo restabeleça a homeostase (WENDELAAR BONGA, 1997; VAL *et al.*, 2004; IWAMA *et al.*, 2006). Neste estudo houve aumento significativo dos valores glicêmicos de *P. lineatus* expostos às duas concentrações de ametrina e do produto formulado, durante 96 h. O resultado obtido no presente estudo indica que a presença do herbicida na água desencadeou resposta de estresse em *P. lineatus* provavelmente por ação do cortisol que pode ser o responsável pela manutenção da glicemia por períodos mais longos (DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA *et al.*, 2003). A manutenção de níveis elevados de glicose plasmática pode levar a um esgotamento das reservas energéticas podendo ser prejudicial para um peixe migrador como o curimba, que precisa dispor de grande quantidade de energia. Em contato com contaminantes, os peixes podem ter seu balanço iônico e a osmolaridade alterados, portanto as concentrações individuais dos íons como o Na^+ , K^+ e Cl^- podem ser parâmetros indicativos de alterações no processo de hiperregulação em peixes de água doce (WENDELAAR BONGA, 1997; WANG & YIN, 1997). Neste estudo não foram observadas alterações significativas nas concentrações de Na^+ e Cl^- , e na osmolaridade de *P. lineatus*. Entretanto, o K^+ aumentou significativamente no plasma dos peixes expostos a $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de ametrina e Gesapax[®] 500. O aumento significativo da concentração do K^+ plasmático observado neste estudo sugere extravazamento de conteúdo celular e pode estar relacionado com a lise dos eritrócitos de *P. lineatus* já discutida anteriormente.

Compostos orgânicos como os agrotóxicos, podem inibir a atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (EVANS, 1987), podendo causar um desequilíbrio iônico e afetar outros processos vitais associados às brânquias (ASSIS *et al.*, 2009). No presente estudo a atividade da enzima NKA foi inibida nas brânquias dos peixes expostos a 5 mg.L^{-1} de Ametrina e Gesapax[®] 500. A NKA teve sua atividade inibida em jovens salmões expostos ao triazínico atrazina em água doce, nas concentrações de 2, 5 e $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ por 7 dias (WARING & MOORE, 2004). Duchnowicz *et al.* (2005), atribuíram a diminuição da atividade da NKA de eritrócitos humanos pelo herbicida fenoxiacético 2,4 D e seus metabólitos, à desestruturação da proteína. Embora o mecanismo pelo qual a ametrina tenha inibido a NKA não seja esclarecido, é provável que tenha sido por ação direta deste herbicida sobre a enzima, e não por danos oxidativos, pois não foi constatado alterações nos componentes antioxidantes de *P. lineatus* neste estudo, o qual será discutido posteriormente.

A anidrase carbônica (AC) atua na regulação do equilíbrio ácido-básico do organismo, produzindo HCO_3^- e H^+ a partir da hidratação do CO_2 (GILMOUR & PERRY, 2009). Esses íons são trocados por Na^+ e Cl^- , portanto, interferências de contaminantes na atividade da AC podem prejudicar a captação de destes íons (EVANS, 1987; CHEW *et al.*, 2006). Neste estudo, não houve alteração na atividade da AC, indicando que esse herbicida não interfere na regulação do equilíbrio ácido-básico de *P. lineatus*, nas condições a que foram expostos.

Em peixes, a subfamília de enzimas CYP1A que faz parte do complexo citocromo P450, é responsável pela desintoxicação de uma ampla variedade de substâncias tóxicas (MOORE *et al.*, 2003). O ensaio EROD utiliza a etoxiresorufina como substrato para determinação da atividade catalítica dessa enzima, devido a sua alta especificidade. Nesse estudo, não houve alterações significativas na atividade da EROD nas concentrações de ametrina e Gesapax[®] 500 testadas. Embora haja evidências de que a isoforma P4501A2 seja a principal enzima atuante na fase I da biotransformação de compostos triazínicos (s-triazinas) em hepatócitos de humanos (LANG *et al.*, 1997), faltam dados sobre a biotransformação da ametrina em peixes.

A GST atua na segunda fase do processo de desintoxicação, conjugando os compostos tóxicos ou seus metabólitos com a GSH para serem eliminados (HERMES-LIMA, 2004). Neste estudo não foram observadas alterações na atividade da GST nos peixes expostos à ametrina e ao Gesapax®500. Resultado diferente foi observado por Elia *et al.* (2002) em *Lepomis macrochirus* expostos a 6 e 9 mg.L⁻¹ do triazínico atrazina por 96h. (WIEGAND *et al.*, 2001). Os resultados aqui obtidos indicam que a metabolização da ametrina não altera a atividade da GST em *P. lineatus*, nas condições a que foram expostos, ou pode não ser esta a sua via de eliminação.

Para evitar os danos oxidativos devido ao aumento de ERO, comum durante a metabolização dos pesticidas (FRANCO *et al.*, 2009), a célula conta com enzimas como a SOD, a CAT e a GPx, e compostos não enzimáticos como a GSH (HERMES-LIMA, 2004). No presente estudo, não foi constatado alterações nas atividades das enzimas de estresse oxidativo (SOD, CAT e GPx) e no conteúdo de GSH nos peixes expostos a ametrina e ao Gesapax®500. Esses resultados indicam que o herbicida não induziu o aumento da produção ERO no tecido hepático de *P. lineatus*, nas condições a que estes foram expostos.

Um dos produtos finais da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), o qual pode ser quantificado por métodos como o ensaio TBARS. A concentração de MDA pode indicar peroxidação lipídica caso mostre valores aumentados. No presente estudo houve diminuição significativa dos níveis de MDA de *P. lineatus* expostos a 5 mg.L⁻¹ de ametrina e de Gesapax® 500 durante 96 h, quando comparado com os respectivos grupos CTR. Outros triazínicos promoveram resultados opostos aos obtidos no presente estudo. Peixes como o *C. punctatus* expostos às concentrações de 4,2, 5,3 e 10,6 mg.L⁻¹ de atrazina em diferentes tempos experimentais (1, 5, 7, 10 e 15 dias) (NWANI *et al.*, 2010) e *C. carpio* expostos ao terbutrin (0,02, 0,2 e 2,0 µg.L⁻¹) por 96 h, apresentaram peroxidação lipídica representada pelo aumento do MDA. Como discutido anteriormente, não houve aumento de ERO, portanto não ocorreu peroxidação lipídica. Esse resultado pode estar relacionado com o baixo consumo de oxigênio devido a redução do Hcto e RBC constatados neste estudo.

Muitos agentes tóxicos são conhecidos por causarem inibição da enzima AChE como os organofosforados e carbamatos (BRETAUD *et al.*, 2000). Alguns herbicidas como o glifosato e o clomazone já mostraram serem inibidores da AChE em peixes (GLUSCZAK *et al.*, 2006; CRESTANI *et al.*, 2007; MIRON *et al.*, 2008; MODESTO & MARTINEZ, 2010 b). Neste estudo, não houve alterações significativas na atividade da AChE cerebral e muscular dos peixes expostos a ametrina e ao Gesapax[®]500 por 96 h, indicando que este herbicida não apresentou ação anticolinesterásica para *P. lineatus*, nas condições deste experimento.

A exposição a contaminantes além de atingir a membrana celular e seus componentes citoplasmáticos, pode também causar efeitos tóxicos no material genético da célula, podendo induzir a quebra da molécula de DNA e/ou provocar modificações em suas bases (VAN DER OOST *et al.*, 2003). No presente estudo foram constatados danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus*, detectados através do ensaio do cometa, após exposição de 96 h à concentração de 5,0 mg.L⁻¹ de ametrina e do Gesapax[®]500. Peixes *C. auratus* foram expostos a três concentrações (5, 10 e 15 µL⁻¹) do triazínico atrazina e de seu produto formulado Gesaprim, por períodos de 2, 4 e 6 dias, onde foi constatado fragmentação do DNA apenas nos peixes expostos à formulação comercial (CAVAS, 2011). Oliveira-Brett e Silva (2002) constataram que herbicidas do grupo das S-triazinas, entre eles a ametrina, interagem com a molécula de DNA, ligando-se às bases adenina e guanina formando adutos, causando a quebra das pontes de hidrogênio. A ação genotóxica da ametrina observada em eritrócito de *P. lineatus* no presente estudo provavelmente seja decorrente da ação direta desse herbicida sobre a molécula de DNA, pois não foram constatadas alterações nos componentes antioxidantes em tecido hepático destes peixes, descartando a possibilidade de danos oxidativo.

Em síntese, não foi observado diferença entre a toxicidade do princípio ativo ametrina e do produto formulado Gesapax[®] 500 para *P. lineatus* no presente estudo, que indica que as substâncias presentes na formulação não interferem na toxicidade do produto. Embora o herbicida testado na sua forma pura ou formulado não tenha promovido alterações nas enzimas de biotransformação e nos componentes antioxidantes, e nem mostrado ação anticolinesterásica, os resultados obtidos nos parâmetros sanguíneos e genotóxico, servem de alerta

quanto a presença destes herbicidas nos ambientes aquáticos, contribuindo no monitoramento de áreas de risco de contaminação por agrotóxicos.

Agradecimentos

Este trabalho é parte da tese de doutorado de L. Pereira realizado junto ao Programa de pós-graduação Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os autores agradecem à Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes, a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro. M. N. Fernandes e C. B. R. Martinez são bolsistas de pesquisa do CNPq e participam do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5).

4.5. REFERÊNCIAS

Almeida, J.S.; Meletti, P.C. Martinez, C.B.R., 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 140 C, 356 – 36.

Alves Costa, J.R.M.; Mela, M.; Silva de Assis, H.C.; Pelletier, E.; Randi, M.A.F.; Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 67, 82–88.

Assis, H.C.S.; Nicareta, L.; Salvo, L.M., Klemz, C.; Truppel, J.H.; Calegari, R., 2009. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 52,1401-1407.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Fagundes, M., Lacerda, L.A., Terra, S., 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia Quelen*, Quoy & Gaimard, Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquacul. Res.** 34, 1465–1469.

Beutler, E., 1975. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods.** Grune&Straton, New York.

Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** 61, 882–888.

Bloom, J.C., Brandt, J.T., 2008. Toxic responses of the blood. In: Casarett, L.J., Klaassen, C.D. **Casarett and Doull's, Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 7 ed. McGraw-Hill Medical, New York. pp 455-484.

Bocquené, G.; Franco, A., 2005. Pesticide contamination of the coastline of Martinique. **Mar. Pollut. Bull.** 51, 612-619.

Brethead, S.; Toutant, J.P.; Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotox. Environ. Saf.** 47, 117-124.

Camargo, M.M.P.; Fernandes, M.N.; Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquat. Toxicol.** 94, 40-46.

Camargo, M.P.; Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 21, 61-69.

Carvalho, C.S.; Fernandes, M.N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Phys.** 151 A, 437-442.

Cattaneo, R.; Loro, V.L.; Spanevello, R.; Silveira, F.A.; Luz, L; D.S. Miron, D.S.; Fonseca, M.B.; Moraes, B.S.; Clasen, B., 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pest. Biochem. Physiol.** 92, 133-137.

Cavas, T., 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food. Chem. Toxicol.** 49, 1431-1435.

Cazenave, J.; Bacchetta, C.; Parma, M.J.; Scarabotti, P.A.; Wunderlin, D.A., 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allo assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environ. Pollut.** 157, 3025-3033.

Chandrasekara, H. U.; Pathiratne, A. 2005. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquacul. Res.** 36, 144-149.

Chew, S.F.; Wilson, J.M.; IP, Y.K.; Randall, D.J., 2006. Nitrogen Excretion and defense against ammonia toxicity. In: Val, A.; Almeida-Val, V. M.; Randall, D. J. (Ed.). **The Physiology of Tropical Fishes**. Academic Press. pp 307-379.

Cox, C., 1998. Glyphosate (Roundup). **J. Pestic. Reform.** 18, 3-17.

Cox, C.; Sorgan, M., 2006. Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: implications for human and environmental health. **Environ. Health. Persp.** 144, 1803-1806.

Crestani, M.; Menezes, C.; Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Lazzari, R.; Duarte, M.F.; Morsch, V.M.F.; Pippi, A.L.; Vieira, V.P., 2006. Effect of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelem*. **Ecotox. Environ. Saf.** 65, 48-55.

Crestani, M.; Menezes, C.; Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Spanevello, R.; Silveira, A.; Gonçalves, F.F.; Zanella, R.; Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelem*) and recovery pattern. **Chemosphere.** 67, 2305-2311.

De La Torre, F.R.; Sabián, A; Ferrari, L. 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. **Chemosphere.** 68, 1582 – 1590.

De Pedro, N.; Guijarro, A. I.; Lopez-Patino, M.A.; Martínez-Álvarez, R.; Delgado, M.J. 2005. Daily and seasonal variations in hematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. **Aquacul. Res.** 36, 1185-1196.

Duchnowicz, P.; Szczepaniak P.; Koter M., 2005. Erythrocytemembrane protein damage by phenoxyacetic herbicides. **Pest. Biochem. Physiol.** 82, 59–65.

Duke, S.O., 1990. Overview of Herbicide Mechanisms of Action. *Environ. Health Persp.* 87, 263-271.

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

Dziewulska-Szwajkowska, D.; Lozinska-Gabska, M.; Adamowicz, A.; Wojtaszek, J.; Dzugaj, A., 2003. The effect of high dose of cortisol on glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase activity, and glucose and fructose-2, 6-bisphosphate concentration in carp tissues (*Cyprinus carpio* L.). **Comp. Biochem. Physiol.** 135 B, 485–491.

Eggens, M.L, Galgani F., (1992) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. **Mar. Environ. Res.** 33, 213-221.

Elia, A. C.; Waller, W. T.; Norton, S. J., 2002. Biochemical Responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to Atrazine Induced Oxidative Stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 809 – 816.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres Jr.V.; Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7, 88–95.

EPA (Environmental Protection Agency), 2005. R.E.D. Facts Ametryn. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/ametryn_fact.pdf. Acesso em 08/2011.

Evans, D.H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environ. Health. Perspect.** 71, 47-58.

Farré, M.; Fernandez, J.; Paez, M.; Granada, L.; Barba, L.; Gutierrez, H.M.; Pulgarin, C.; Barceló, D., 2002. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Anal. Bioanal. Chem.** 373, 704-709.

Federici, G.; Shaw, B.J.; Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquat. Toxicol.** 84, 415-430.

Fernández-Vega, C.; Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Andreu, E., 2002. Thiobencarb-Induced Changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pest. Biochem. Physiol.** 72, 55-63.

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

Franco, R.; Sánchez-Olea, R.; Reyes-Reyes, E.M.; Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutat. Res.** 674, 3-22.

Gilmour, K.M.; Perry, S.F., 2009. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. **J. Exp. Biol.** 212, 1647-1661.

Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Crestani, M.; Fonseca, M.B.; Pedron, F.A.; Duarte, M.F.; Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotox. Environ. Saf.** 65, 237-241.

Gonzalez, R.J.; Wilson, R.W.; Wood, C.M., 2006. Ionoregulation in tropical fishes from ion-poor, acidic blackwaters: In Val, A.L.; Almeida Val, V.M.; Randall, D.J. (Ed.). **The Physiology of Tropical Fishes**. Academic Press. pp 396-442.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Wiley-Liss, Hoboken. pp 319-368.

Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. **Comp. Biochem. Physiol.** 136 B, 593-620.

Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human redcells in health and disease. **J. Haematol.** 25, 563-575.

Hussein, S. Y.; El-Nasser, M. A.; Ahmed, S. M., 1996. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 57, 503-5010.

Hwang, P.P.; Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comp. Biochem. Physiol.** 148 A, 479-497.

Iwama, G.K.; Afonso, L.O.B.; Vijayan, M.M., 2006. Stress in fish. In: Evans, D.H.; Claiborne, J.B. **The Physiology of Fishes**. 3 ed. New York: CRC Press. pp 319-342.

Jacomini, A.E.; Camargo, P.B.; Avelar, W.E.P.; Bonato, P.S., 2011. Assessment of ametryn contamination in river water, river sediment, and mollusk bivalves in São Paulo State, Brazil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 60, 452-461.

Keen, J.H.; Habig, W.H.; Jakobi, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **J. Biol. Chem.** 251, 6183-6188.

Kobayashi, H.; Suguyama, C.; Morikawa, Y.; Hayashi, M.; Sofuni, T., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Commun.** 3, 103-115.

Lang, D.H.; Rettie, A.E.; BoEcker, R.H., 1997. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. **Chem. Res. Toxicol.** 10, 1037-1044.

Lapivaara, J.; Mikkonen, J.; Soimasuo, M., 2002. Attenuated carbohydrate and gill Na^+ , K^+ - ATPase stress responses in Whitefish caged near bleached Kraft Mill discharges. **Ecotox. Environ. Saf.** 51, 5-11.

Lee, R.F.; Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.** 544, 43-64.

Lingwood, D.; Harauz, G.; Ballantyne, J.S., 2006. Decoupling the Na^+/K^+ /ATPase in vivo: A possible new role in the gills of freshwater fishes. **Comp. Biochem. Physiol.** 144 A, 451-457.

Lombardi, J.V.; Machado-Neto, J.G.; Brossi-Garcia, A.L.; Marques, H.L.A.; Kubo, E., 2001. Acute toxicity of the pesticides endosulfan and ametryne to the freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* De Man. Bull. **Environ. Contam. Toxicol.** 67, 665- 671.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randal, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. **J. Biol Chem.** 193, 265-275.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicol.** 101, 13-30.

Mayer, F.L.; Versteeg, D.J.; Mckee, M.J.; Folmar, L.C.; Graney, R.L.; Mccume, D.C.; Rattner B.A., 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrie Jr, P.M.; Bergman, H.L. (Ed.). **Biomarkers Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers. pp211- 334.

McCord, J.M.; Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** 44, 6049-6055.

Mikula, P.; Blahova, J.; Kruzikova, K.; Havelkova, M.; Nemethova, D.; Hulak, M.; Svobodova, Z., 2009. Effects of the herbicide LASSO MTX (Alachlor 42% W/V) on

biometric parameters and liver biomarkers in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Pestic. Biochem. Physiol.** 93, 13–17.

Ministério da Agricultura, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz>. Acesso em 12/2011.

Miron, D.S.; Pretto, A.; Crestani, M.; Gluszczak, L.; Schetinger, M.R.; Loro, V.L.; Morsch, V.M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere.** 74, 1-5.

Miron, D.S.; Shetinger, M.R.; Morsch, V.M.; Baldisseroto, B.; Tierno, M.A.; Moraes, G; Vieira, V.L.P., 2005. Effects of herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelem*) (Heptapteridae). **Ecotox. Environ. Saf.** 61, 398-403.

Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R., 2010 a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere.** 81, 781-787.

Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R., 2010 b. Roundap[®] cause oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere.** 78, 294-299.

Monteiro, D.A.; Almeida, J.A.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp. Biochem. Physiol.** 143 C, 141–149.

Moore, A., Scott, A.P., Lower, N., Katsiadaki, I., Greenwood, L., 2003. The effects of 4-nonylphenol and atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. **Aquaculture.** 222, 253–263.

Nolan, D.T., 2000. “Unpublished results”. **Skin response of fish to stressors.** Doctorate thesis – Catholic University of Nijmegen, Holand.

Nwani, C.D.; Lakra, W.S.; Nagpure, N.S.; Kumar, R.; Kushwaha, B.; Srivastava, S.K., 2010. Toxicity of the Herbicide Atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). **Int. J. Environ. Res. Public Health.** 7, 3298-3312.

Oliveira-Brett, A.M.; Silva, L.A., 2002. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives. **Anal. Bioanal. Chem.** 373, 717–723.

Oruç, E.Ö.; Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 23, 48-55.

Parvez, S.; Sayeed, I.; Raisuddin, S., 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. **Ecotox. Environ. Safe.** 65, 62–66.

Paulino, M.G.; Sakuragui, M.M.; Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**. 86, 1-7.

Pereira Maduenho, L.; Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 148 C, 265–272.

Quabius, E.S.; Balm, P.H.M.; Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **Gen. Comp. Endocrinol.** 108, 472-482.

Rael, L.T.; Thomas, G.W.; Craun, M.L. Curtis, G.C.; Bar-Or, R.; Bar-Or, D., 2004. Lipid peroxidation and the thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids. **J. Biochem. Mol. Biol.** 37, 749-752.

Rodrigues, N.R., Almeida, F.S., 2011. **Guia de Herbicidas**, 6 ed. Grafimark.

Schreiber, E.A.; Otter, R.R.; Van den Hurk, P., 2006. A biomarker approach to measure biological effects of contaminant exposure in largemouth bass from lake Conestee, South Carolina, USA. **Environ. Toxicol. Chem.** 25, 1926–1932.

Simonato, J.D.; Guedes, C.L.B.; Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotox. Environ. Safe.** 69, 112-120.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice R.R.; Schneider E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175, 184-191.

Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Orti, G., 2001. Populations structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Mol. Ecol.** 10, 407-417.

Stagg, R.M.; Rusin, J.; Brown, F., 1992. Na⁺K⁺-ATPase activity in the gills of the flounder (*Platichthys flesus*) in a relation to mercury contamination in the Firth of Forth. **Mar. Environ. Res.** 33, 255–266.

Stassen, M.J.M.; van de Ven, M.W.P.M.; van der Heide, T.; Hiza, M.A.G.; van der Velde, G.; Smolders, J.P., 2010. Population dynamics of the migratory fish *Prochilodus lineatus* in a neotropical river: the relationships with river discharge, flood pulse, El Niño and fluvial megafan behaviour. **Neotrop. Ichthyol.** 8, 113-122

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R. A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Ed.), **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers, MI, USA. pp 235-335.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R., 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. **J. Fish Biol.** 71, 383-388.

USGS (US Geological Survey Science for a Pesticides in Stream Sediment and Aquatic Biota). 2010. <http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/pubs/fs09200/fs09200.pdf>. Acesso em 09/ 2010.

Val, A.L.; Silva, M.N.P.; Varela-Val, M.F., 2004. Estresse em peixes – ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: Ranzoni-Paiva, M.J.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. (Org.) **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Varela, São Paulo. pp 75-88.

Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotox. Environ. Safe**. 64, 178-189.

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.

Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mut. Res**. 631, 36-43.

Velisek, J.; Stara, A.; Kolarova, J.; Svobodova, Z., 2011. Biochemical, physiological and morphological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. **Pestic. Biochem. Physiol**. 100, 305-313.

Vitale, A.M.; Monserrat, J.M.; Castilho, P.; Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comput. Biochem. Physiol**. 122 C, 121–129.

Wang, X.; Yin, Z., 1997. Using GIS to assess the relationship between land use and water quality at a watershed level. **Environ. Internat**. 23, 103-14.

Waring, C.P.; Moore, A., 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. **Aquat. Toxicol**. 66, 93–104.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. **Physiol. Rev**. 77, 591-620.

Wiegand, C.; Krause, E.; Steinberg, C.; Pflugmacher, S., 2001. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicol. Environ. Saf**. 49, 199-205.

Wilhelm Filho, D., 2007. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Front. Biosci*. 12, 1229-1237. Winkaler, E.U.; Santos, T.R.M.; Machado-Neto, J.G.; Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol**. 145 C, 236–244.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que:

- A exposição aguda a concentrações subletais do herbicida à base de clomazone Gamit[®] 500 causa prejuízos à saúde de *Prochilodus lineatus*, por interferência desse herbicida em parâmetros hematológicos e bioquímicos do peixe.
- Os parâmetros sanguíneos (Hcto, Hb, RBC) e bioquímicos, assim como as atividades das enzimas GST, CAT, GPx e AChE, mostraram-se importantes na avaliação da toxicidade do herbicida clomazone para *P. lineatus*.
- O herbicida ametrina e seu produto formulado Gesapax[®] 500 mostraram-se tóxicos para *P. lineatus* nas condições a que foram expostos, por interferir em alguns parâmetros hematológicos e iônico, e por serem genotóxicos para a espécie.
- Não houve diferença entre a toxicidade do princípio ativo ametrina e do produto formulado, o Gamit[®] 500 para a espécie *P. lineatus*, portanto os componentes da fórmula não interferem na toxicidade do herbicida.
- Podemos destacar os parâmetros sanguíneos e genotóxicos como tendo maior relevância para avaliar a toxicidade da ametrina e do Gesapax[®] 500 para *P. lineatus*.
- Embora a alteração na glicemia não seja uma resposta específica, ela contribui para a compreensão de que a exposição ao herbicida ametrina é uma situação de estresse para o animal, que pode levar ao esgotamento das reservas energéticas.
- Mais estudos são necessários sobre os parâmetros iônicos e a atividade da Na⁺/K⁺ATPase, nos peixes expostos à ametrina e ao

Gesapax[®]500, para se determinar a relevância destes como biomarcadores a serem utilizados na avaliação dos efeitos tóxicos destes herbicidas para *P. lineatus*.

- As análises integradas dos biomarcadores selecionados para este estudo indicam que os herbicidas clomazone e ametrina são tóxicos para *P. lineatus*.
- Os biomarcadores utilizados neste estudo tem potencial para serem empregados no monitoramento de áreas de uso intensivo de agrotóxicos, contribuindo na prevenção de riscos ecológicos para a espécie nativa *P. lineatus* e outras espécies aquáticas.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

- Adams, S.M.; Shugart, L.R.; Southworth, G.R.; Hinton, D.E., 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: McCarthy, J.F.; Shugart, L.R. (Ed.), **Biomarkers of Environmental Contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers. pp 333-353.
- Almeida, J.S.; Meletti, P.C. Martinez, C.B.R., 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 140 C, 356 – 36.
- Alves Costa, J.R.M.; Mela, M.; Silva de Assis, H.C.; Pelletier, E.; Randi, M.A.F.; Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 67, 82–88.
- ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) 2011. <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 07/2011.
- Armas, E.D.; Monteiro, R.T.R., 2005. Uso de agrotóxicos em cana de - açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Quím. Nova.** 28, 975-982.
- Assis, H.C.S.; Nicareta, L.; Salvo, L.M., Klemz, C.; Truppel, J.H.; Calegari, R., 2009. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 52, 1401-1407.
- Avilez, I.M., Hori, T.S.F., Almeida, L.C., Hackbarth, A., da Cunha-Bastos, J., da Cunha-Bastos, V.L., Moraes, G., 2008. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei: Characidae). **Comp. Biochem. Physiol.** 148 C, 136–142.
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Fagundes, M., Lacerda, L.A., Terra, S., 2003. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen*, Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquacul. Res.** 34, 1465–1469.
- Beutler, E., 1975. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. Grune&Straton, New York.
- Beutler, E., Duron, O., Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** 61, 882–888.
- Bloom, J.C., Brandt, J.T., 2008. Toxic responses of the blood. In: Casarett, L.J., Klaassen, C.D. Casarett and Doull's, **Toxicology: The Basic Science of Poisons**, 7 ed. McGraw-Hill Medical, New York. pp 455-484.
- Bocquené, G.; Franco, A., 2005. Pesticide contamination of the coastline of Martinique. **Mar. Pollut. Bull.** 51, 612-619.

Bortoluzzi, E.C.; Rheinheimer, D.S.; Gonçalves, C.S.; Pellegrini, J.B.R.; Zanella, R.; Copetti, A.C.C., 2006. **Rev. Bras. Eng. Agríc.Ambient.** 10, 881-887.

Bretau, S.; Toutant, J.P.; Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotox. Environ. Saf.** 47, 117-124.

Camargo, M.M.P.; Fernandes, M.N.; Martinez, C.B.R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquat.Toxicol.** 94, 40-46.

Camargo, M.P.; Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 21, 61-69.

Carvalho, C.S.; Fernandes, M.N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Phys.** 151 A, 437-442.

Cattaneo, R.; Loro, V.L.; Spanevello, R.; Silveira, F. A.; Luz, L; D.S. Miron, D.S.; Fonseca, M.B.; Moraes, B.S.; Clasen, B., 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pest. Biochem. Physiol.** 92, 133-137.

Cavalcante, D.G.S.M, Martinez, C.B.R, Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutat. Res.** 655, 41-46.

Cavas, T., 2011. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. **Food. Chem. Toxicol.** 49, 1431-1435.

Çavaş, T.; Könen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis.** 22, 263-268.

Cazenave, J.; Bacchetta, C.; Parma, M.J.; Scarabotti, P.A.; Wunderlin, D.A., 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allo assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environ. Pollut.** 157, 3025-3033.

CDPR (Departamento de Regulação de Pesticidas da Califórnia), 2003. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/registration/ais/publicreports/3537.pdf>. Acesso em 11/2011.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), 2010. **Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo.** <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>. Acesso em 12/2011.

Ceyhun, S.B.; Şentürk, M.; Erdoğan, Ö.; Küfrevioğlu, O.I., 2010. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. **Pestic. Biochem. Physiol.** 97, 177-181.

Chandrasekara, H. U.; Pathiratne, A. 2005. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquacul. Res.** 36, 144-149.

Chew, S.F.; Wilson, J.M.; IP, Y.K.; Randall, D.J., 2006. Nitrogen excretion and defense against ammonia toxicity. In: Val, A.; Almeida-Val, V. M.; Randall, D. J. (Ed.). **The Physiology of Tropical Fishes**. Academic Press. pp 307-379.

Coat, S.; Bocquené, G.; Godard, E., 2006. Contamination of some aquatic species with the organochlorine pesticide chlordecone in Martinique. **Quat. Living Resour.** 19, 181–187.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2011. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011/** – Brasília. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf. Acesso em 01/2012.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) 2005. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução No. 357** de 17 de março de 2005. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>>. Acesso em 03/2010.

Cox, C., 1998. Glyphosate (Roundup). **J. Pestic. Reform.** 18, 3-17.

Cox, C.; Sorgan, M., 2006. Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: implications for human and environmental health. **Environ. Health. Persp.** 144, 1803-1806.

Crestani, M.; Menezes, C.; Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Lazzari, R.; Duarte, M.F.; Morsch, V.M.F.; Pippi, A.L.; Vieira, V.P., 2006. Effect of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelem*. **Ecotox. Environ. Saf.** 65, 48-55.

Crestani, M.; Menezes, C.; Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Spanevello, R.; Silveira, A.; Gonçalves, F.F.; Zanella, R.; Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelem*) and recovery pattern. **Chemosphere.** 67, 2305-2311.

De La Torre, F.R.; Sabián, A; Ferrari, L. 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. **Chemosphere.** 68, 1582 – 1590.

De Pedro, N.; Guijarro, A.I.; Lopez-Patino, M.A.; Martínez-Álvarez, R.; Delgado, M.J. 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. **Aquacul. Res.** 36, 1185-1196.

Deneer, J.W., 2000. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. **Pest. Manag. Sci.** 56, 516-520.

Di Giulio, R.T.; Benson, W.H.; Sanders, B.M.; Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity, In: Rand, G.M. (Ed.), **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment, 2nd ed. Taylor & Francis, Washington. pp 523–561.

Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E., 2008. **The Toxicology of fishes**. Taylor & Francis, 1071 p.

Dores, E.F.G.C.; Carbo, L.; Ribeiro, M.L.; De-Lamonica-Freire, E.M., 2008. Pesticide levels in ground and surface waters of Primavera do Leste region, Mato Grosso, Brazil. **J. Chromatogr. Sci.** 46, 585-590.

Dores, E.F.G.C.; De-Lamonica-Freire, E.M., 2001. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Quim. Nova.** 24, 27-36.

Dorval, J.; Leblond, V.S.; Hontela, A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. **Aquat. Toxicol.** 63, 229-241.

Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. **Phys. Rev.** 82, 47- 95.

Duarte, C.L.; Andrade, D.C.; Melo, R.P. Nagatomi, H.R.; Mori, M.N., 2009. Decontamination of ametryn HDPE packaging using electron beam accelerator. **Radiat. Phys. Chem.** 78, 725–728.

Duchnowicz, P.; Szczepaniak P.; Koter M., 2005. Erythrocytemembrane protein damage by phenoxyacetic herbicides. **Pest. Biochem. Physiol.** 82, 59–65.

Duke, S.O., 1990. Overview of Herbicide Mechanisms of Action. **Environ. Health. Persp.** 87, 263-271.

Durmaz, H.; Sevgiler, Y.; Üner, N., 2006. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. **Pest. Biochem. Physiol.** 84, 215–22.

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

Dziewulska-Szwajkowska, D.; Lozinska-Gabska, M.; Adamowicz, A.; Wojtaszek, J.; Dzugaj, A., 2003. The effect of high dose of cortisol on glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase activity, and glucose and fructose-2, 6-bisphosphate concentration in carp tissues (*Cyprinus carpio* L.). **Comp. Biochem. Physiol.** 135 B, 485-491.

Eggens, M.L.;Galgani, F., (1992) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in flatfish: fast determination with a fluorescence plate-reader. **Mar. Environ. Res.** 33, 213-221.

Elia, A. C.; Waller, W. T.; Norton, S. J., 2002. Biochemical Responses of Bluegill Sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to Atrazine Induced Oxidative Stress. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 68, 809–816.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres Jr., V.; Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol.** 7, 88–95.

EPA (Environmental Protection Agency), 2005. .E.D. **Facts Ametryn**. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/ametryn_fact.pdf. Acesso em 08/2011.

EPA (Environmental Protection Agency), 2007. **Clomazone Summary Document Registration Review: Initial Docket January, 2007**. http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/clomazone/. Acesso em 04/2010.

EPA (Environmental Protection Agency), 2009. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/lindane.cfm>. Acesso em 12/2011.

Erickson, R.J.; Nichols, J.W.; Cook, P.M.; Ankley, G.T., 2008. Bioavaliability of chemical contaminants in aquatic system. In: Di Giulio, R.T, Hinton, E.D. (Eds). **The Toxicology**, Taylor & Francis. pp 523–561.

Evans, D.H., 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environ. Health. Perspect.** 71, 47-58.

Evans, G.O., 2008. **Animal Hematology: A Practical, Guide for Toxicologists and Biomedical Researchers**. Taylor & Francis.

Farré, M.; Fernandez, J.; Paez, M.; Granada, L.; Barba, L.; Gutierrez, H.M.; Pulgarin, C.; Barceló, D., 2002. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Anal. Bioanal. Chem.** 373, 704-709.

Federici, G.; Shaw, B.J.; Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquat. Toxicol.** 84, 415–430.

Ferhatoglu, Y.; Avdiushko, S.; Barrett, M., 2005. The basis for the safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. **Pestic. Biochem. Physiol.** 81, 59–70.

Fernandes, M.N.; Mazon, A.F., 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val, A.L.; Kapoor, B.G., (Ed.). **Fish Adaptations**. Enfield: Science Publishers

Fernández-Vega, C.; Sancho, E.; Ferrando, M.D.; Andreu. E., 2002. Thiobencarb-Induced Changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pest. Biochem. Physiol.** 72, 55–63.

Ferrari, A.; Venturino, A.; D'Angelo, A. M. P., 2007. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. **Pest. Biochem. Physiol.** 88, 134–142.

Franco, R.; Sánchez-Olea, R.; Reyes-Reyes, E.M.; Panayiotidis, M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutat. Res.** 674, 3–22.

Fulton, M.H. Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environ. Toxicol. Chem.** 20, 37-45.

Gao, N.; Deng, Y.; Zhao, D., 2009. Ametryn degradation in the ultraviolet (UV) irradiation/hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment. **J. Hazard. Mater.** 164, 640–645.

Gilmour, K.M.; Perry, S.F., 2009. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. **J. Exp. Biol.** 212, 1647–1661.

Gluszczak, L.; Miron, D.S.; Crestani, M.; Fonseca, M.B.; Pedron, F.A.; Duarte, M.F.; Vieira, V.L.P., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotox. Environ. Saf.** 65, 237–241.

Gonzalez, R.J.; Wilson, R.W.; Wood, C.M., 2006. Ionoregulation in tropical fishes from ion-poor, acidic blackwaters: In Val, A.L.; Almeida Val, V.M.; Randall, D.J. (Ed.). **The Physiology of Tropical Fishes**. Academic Press. pp 396–442.

Gubiani, É.A.; Gomes, L.C.; Agostinho, A.A.; Okada, E.K., 2007. Persistence of fish populations in the upper Paraná River: effects of water regulation by dams. **Ecol. Freshw. Fish.** 16, 191–197.

Heath, A.G., 1995. **Water Pollution and Fish Physiology**, 2 ed. Lewis Publishers, Boca Raton.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Wiley-Liss, Hoboken. pp 319–368.

Hinton, E.H.; Segner, H.; Au, D.W.T.; Kullman, S.W.; Hardman, R.C., 2008. Liver Toxicity, In: Di Giulio, R.T.; Hinton, (Ed.), **The Toxicology of Fish**. Taylor & Francis. pp 327–400.

Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. **Comp. Biochem. Physiol.** 136 B, 593–620.

Hodgson, E., 2001. In vitro human phase I metabolism of xenobiotics I: pesticides and related chemicals used in agriculture and public health, September 2001. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 15, 296–299.

Hopkins, J., Tudhope, G.R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **J. Haematol.** 25, 563–575.

Hussein, S. Y.; El-Nasser, M. A.; Ahmed, S. M., 1996. Comparative studies on the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 57, 503–5010.

Hwang, P.P.; Lee, T.H., 2007. New insights into fish ionoregulation and mitochondrion-rich cells. **Comp. Biochem. Physiol.** 148 A, 479–497.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), 2010. **Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma**

abordagem ambiental. Rebelo, R.F.; Vasconcelos, R.A.; Buys, B.D.M.C.; Rezende, J.A.; Moraes, K. O.C.; Oliveira, R.P. Brasília. Ibama.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2010. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>. Acesso em 04/2011.

Iwama, G.K.; Afonso, L.O.B.; Vijayan, M.M., 2006. Stress in fish. In: Evans, D.H.; Claiborne, J.B. **The Physiology of Fishes**. 3 ed. New York: CRC Press. 9, 319-342.

Jacomini, A.E.; Camargo, P.B.; Avelar, W.E.P.; Bonato, P.S., 2011. Assessment of ametryn contamination in river water, river sediment, and mollusk bivalves in São Paulo State, Brazil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 60, 452-461.

Kavitha, P.; Rao, J.V., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pest. Biochem. Physiol.** 87, 182–188.

Keen, J.H.; Habig, W.H.; Jakobi, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases. **J. Biol. Chem.** 251, 6183-6188.

Kirby, M.F., 2000. The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. **Mar. Pollut. Bull.** 40, 780-791.

Kobayashi, H.; Suguyama, C.; Morikawa, Y.; Hayashi, M.; Sofuni, T., 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Commun.** 3, 103–115.

Köprücü, S.S.; Köprücü, K.; Ural, M.S.; Ispir Ü.; Pala, M., 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). **Pestic. Biochem. Physiol.** 86, 99-105.

Lam, K.; Tsui, T.; Nakano, K. Randall, D. J., 2006. Physiological adaptations of fishes to tropical intertidal environments. In: Val, A.; Almeida-Val, V. M.; Randall, D. J. (Ed). **The Physiology of Tropical Fishes**. Academic Press. pp 634.

Lang, D.H.; Rettie, A.E.; BoÈcker, R.H., 1997. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbuthylazine, ametryne, and terbutryne in human liver microsomes. **Chem. Res. Toxicol.** 10, 1037-1044.

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.** 147 C, 222–231.

Lapivaara, J.; Mikkonen, J.; Soimasuo, M., 2002. Attenuated carbohydrate and gill Na^+ , K^+ - ATPase stress responses in Whitefish caged near bleached Kraft Mill discharges. **Ecotox. Environ. Saf.** 51, 5-11.

Lee, R.F.; Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat. Res.** 544, 43-64.

Li, X.; Zhang, Q.; Dai, J.; Gan, Y.; Zhou, J.; Yang, X.; Cao, H.; Jiang, G.; Xu, M.; 2008. Pesticide contamination profiles of water, sediment and aquatic organisms in the effluent of Gaobeidian waste water treatment plant. **Chemosphere.** 72, 1145-1151.

Lingwood, D.; Harauz, G.; Ballantyne, J.S., 2006. Decoupling the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ in vivo: A possible new role in the gills of freshwater fishes. **Comp. Biochem. Physiol.** 144 A, 451-457.

Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 120 A, 43-49.

Lombardi, J.V.; Machado-Neto, J.G.; Brossi-Garcia, A.L.; Marques, H.L.A.; Kubo, E., 2001. Acute toxicity of the pesticides endosulfan and ametryne to the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* De Man. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 67, 665-671.

Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randal, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. **J. Biol Chem.** 193, 265-275.

Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicol.** 101, 13-30.

Machado, M.R.F.; Foresti, F., 2009. Rendimento e composição química do filé de *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu, Brasil. **Arch. Zootec.** 58, 663-670.

Makrakis, S.; Gomes, L.C.; Makrakis, M.C. Fernandez, D.R.; Pavanelli, C.S., 2007. The Canal da Piracema at Itaipu Dam as a fish pass system. **Neotrop. Ichthyol.** 5, 185-195.

Mao, Z.L.X., 2011. Global multiquadric collocation method for groundwater contaminant source identification. **Environ. Modell. Softw.** 26, 1611-1621.

Marchesan, E.; Sartori, G.M.S.; Avila, L.A.; Machado, S.L.O.; Zanella, R.; Primel, E.G.; Macedo, V.R.M.; Marchezan, M.G., 2010. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc. Rural.** 40, 1053-1059.

Martinez, C. B. R., 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Silva-Souza, A. T. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil.** ABRAPOA. pp 43-62.

Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.; Pimenta, J.A. (Ed.), **A bacia do rio Tibagi.** Londrina. pp 551-577.

Mayer, F.L.; Versteeg, D.J.; Mckee, M.J.; Folmar, L.C.; Graney, R.L.; Mccume, D.C.; Rattner B.A., 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrie Jr, P.M.; Bergman, H.L. (Eds). **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers. pp 211- 334.

McCord, J.M.; Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** 44, 6049–6055.

Mikula, P.; Blahova, J.; Kruzikova, K.; Havelkova, M.; Nemethova, D.; Hulak, M.; Svobodova, Z., 2009. Effects of the herbicide LASSO MTX (Alachlor 42% W/V) on biometric parameters and liver biomarkers in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Pestic. Biochem. Physiol.** 93, 13–17.

Miller, D.S., 2008. Cellular transport and elimination. In: Smart, R.C.; Hodgson E. (Ed.). **Molecular and Biochemical Toxicology**. John Wiley & Sons. pp 273-285.

Min, E.Y.; Kang, J.C., 2008. Effect of waterborne beromyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Pestic. Biochem. Physiol.** 92, 138-143.

Miron, D.S.; Pretto, A.; Crestani, M.; Gluszczak, L.; Schettinger, M.R.; Loro, V.L.; Morsch, V.M., 2008. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere.** 74, 1-5.

Miron, D.S.; Shettinger, M.R.; Morsch, V.M.; Baldisserotto, B.; Tierno, M.A.; Moraes, G; Vieira, V.L.P., 2005. Effects of herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotox. Environ. Saf.** 61, 398-403.

Miron, D.S.; Silva, L.V.F.; Golombieski, J.I.; Machado, S.L.O.; Marchezan, E.; Baldisserotto, B., 2004. Lethal concentration of clomazone, metsulfuron-metil, and quinclorac for silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Ciênc. Rural.** 34, 1465-1469.

Modesto, K.A.; Martinez, C.B. R., 2010 a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere.** 81, 781-787.

Modesto, K.A.; Martinez, C.B.R., 2010 b. Roundup® cause oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere.** 78, 294-299.

Monteiro, D.A.; Almeida, J.A.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp. Biochem. Physiol.** 143 C, 141–149.

Moore, A., Scott, A.P., Lower, N., Katsiadaki, I., Greenwood, L., 2003. The effects of 4-nonylphenol and atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. **Aquaculture** 222, 253– 263.

Moraes, M.F.P.G; Barbola, I.F.; Guedes, É.A.C., 1997. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do “curimbatá”, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagora do Sul do Brasil. **Rev. Bras. Zool.** 14, 169-180.

Moraes, B.S.; Loro, V.L.; Gluszcak, L.; Pretto, A.; Menezes, C.; Marchezan, E.; Machado, S.O., 2007. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters, of teleost fish (*Leporinus otusidens*). **Chemosphere.** 68, 1597-1601.

Nascimento, I.A.; Pereira, S.A.; Leite, M.B., 2006. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. (Ed.). **Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações.** Rima, São Paulo. pp 413-431.

Nikinmaa, M., 1992. How does environmental pollution affect red cell function in fish? **Aquatic Toxicol.** 22, 227-238.

Nolan, D.T., 2000. **Skin response of fish to stressors.** Doctorate thesis – Catholic University of Nijmegen, Holand.

Noldin, J.A.; Hermes, L.C.; Fay, E.F.; Eberhardt, D.S.; Rossi, M.A., 2001. Persistência do herbicida clomazone no solo e na água quando aplicado na cultura do arroz irrigado, sistema pré-germinado. **Planta Daninha.** 19, 401-408.

Nwani, C.D.; Lakra, W.S.; Nagpure, N.S.; Kumar, R.; Kushwaha, B.; Srivastava, S.K., 2010. Toxicity of the Herbicide Atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). **Int. J. Environ. Res. Public Health.** 7, 3298-3312.

Oliveira-Brett, A.M.; Silva, L.A., 2002. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives. **Anal. Bioanal. Chem.** 373, 717–723.

Oruç, E.Ö.; Usta, D., 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 23, 48-55.

Parma, M.J.A.; Loteste, A.; Campana, M.; Bacchetta, C., 2007. Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. **J. Environ. Biol.** 28, 147-149.

Parvez, S.; Sayeed, I.; Raisuddin, S., 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. **Ecotox. Environ. Safe.** 65, 62–66.

Paulino, M.G.; Sakuragui, M.M.; Fernandes, M.N., 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere.** 86, 1-7.

Payne, J.F.; Mathieu, A.; Melvin, W.; Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in New foundland. **Mar. Poll. Bull.** 32, 225-231.

Pereira Maduenho, L.; Martinez, C.B.R., 2008. Acute effects of diflufenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 148 C, 265–272.

Polard, T.; Jean, S.; Gauthier, L.; Laplanche, C.; Merlina, G.; Sánchez-Pérez; J.M.; Pinelli, E., 2011. Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. **Aquat. Toxicol.** 10, 126-134.

Primel, E.G., 2005. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição teórica e monitoramento. **Quím. Nova.** 28, 605-609.

Pritchard, J.B., 1993. Aquatic Toxicology: Past, present, and prospects. 1993. **Environ. Health Persp.** 100, 249-257.

Quabius, E.S.; Balm, P.H.M.; Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **Gen. Comp. Endocrinol.** 108, 472-482.

Quayle, W.; Oliver, D.P.; Zrna, S.L., 2006. Field dissipation and environmental hazard assessment of clomazone, molinate, and thiobencarb in Australian rice culture. **J. Agr. Food Chem.** 54, 7213-7220.

Rael, L.T.; Thomas, G.W.; Craun, M.L. Curtis, G.C.; Bar-Or, R.; Bar-Or, D., 2004. Lipid peroxidation and the thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids. **J. Biochem. Mol. Biol.** 37, 749-752.

Rahimi, R., Abdollahi, M., 2007. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. **Pestic. Biochem. Physiol.** 88, 115–121.

Ramesh, M., Srinivasan, R., Saravanan, M., 2009. Effect of atrazine (Herbicide) on blood parameters of common carp *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes). **Afr. J. Environ. Sci. Technol.** 3, 453-458.

Rand, G.M., 1995. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**, 2 ed. Washington: Taylor & Francis.

Rand, G.M.; Petrocelli, S.R., 1985. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 666 p.

Reed, D.J., 2008. Glutathione-dependent Mechanisms in chemically induced cell injury and cellular protection mechanisms. In: Smart, R.C.; Hodgson E. (Ed.). **Molecular and Biochemical Toxicology**. John Wiley & Sons. pp 333-357.

Rodrigues, N.R., Almeida, F.S., 2011. **Guia de Herbicidas**, 6 ed. Grafimark. 697 p.

Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. **Toxicol. Sci.** 94, 3–21.

Santos, F.M., Marchesan, E., Machado, S.L.O., Avila, L.A., Zanella, R.; Gonçalves, F.F., 2008. Persistência dos herbicidas imazethapyr e clomazone em lâmina de água do arroz irrigado. **Planta Daninha**. 26, 875-881.

Schreiber, E.A.; Otter, R.R.; Van den Hurk, P., 2006. A biomarker approach to measure biological effects of contaminant exposure in largemouth bass from lake Conestee, South Carolina, USA. **Environ. Toxicol. Chem.** 25, 1926–1932.

Shibatta, O.A.; Gealh, A.M.; Bennemann, S.T., 2007. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Biota Neotrop.** 7, 125-134.

Simonato, J.D.; Guedes, C.L.B.; Martinez, C.B.R., 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotox. Environ. Safe.** 69, 112-120.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). 2011. <http://www.sindag.com.br/>. Acesso em 11/2011.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). 2009a. http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=1399. Acesso em 11/2011.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) 2009b. <http://www.sindag.com.br/upload/OSetordeDefensivosagricolasnoBrasil.doc>. Acesso em 11/2011.

Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice R.R.; Schneider E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175, 184-191.

Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Orti, G., 2001. Populations structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Mol. Ecol.** 10, 407-417.

Speranza, E.D.; Colombo, J.C., 2009. Biochemical composition of a dominant detritivorous fish *Prochilodus lineatus* along pollution in the Paraná-Rio de la Plata Basin. **J. Fish Biol.** 74, 1226-1244.

Stagg, R.M.; Rusin, J.; Brown, F., 1992. Na⁺K⁺-ATPase activity in the gills of the flounder (*Platichthys flesus*) in a relation to mercury contamination in the Firth of Forth. **Mar. Environ. Res.** 33, 255–266.

Stassen, M.J.M.; van de Ven, M.W.P.M.; van der Heide, T.; Hiza, M.A.G.; van der Velde, G.; Smolders, J.P., 2010. Population dynamics of the migratory fish *Prochilodus lineatus* in a neotropical river: the relationships with river discharge, flood pulse, El Niño and fluvial megafan behavior. **Neotrop. Ichthyol.** 8, 113-122.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P. A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R. J., Kimerly, R. A., Mehrle, P. M., Jr, Bergman, H. L. (Ed.), **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers. pp 235-335.

Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29, 1715-1733.

Syakalima, M.; Choongo, K.; Mwenechanya, R.; Wepener, V.; Yamasaki, M.; Maede, Y., 2006. Pesticide/Herbicide pollutants in Kafue river and a preliminary investigation into their biological effect through catalase levels in fish. **Jpn. J. Vet. Res.** 54, 119-128.

Tang, Z.; Yang, Z.; Shen, Z.; Niu, J.; Cai, Y., 2008. Residues of organochlorine pesticides in water and suspended particulate matter from the Yangtze River catchment of Wuhan, China. **Environ. Monit. Assess.** 137, 427-439.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R., 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. **J. Fish Biol.** 71, 383-388.

USGS (US Geological Survey Science for a Pesticides in Stream Sediment and Aquatic Biota). 2010. <http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/pubs/fs09200/fs09200.pdf>. Acesso em 09/ 2010.

Val, A.L.; Silva, M.N.P.; Varela-Val, M.F., 2004. Estresse em peixes – ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: Ranzani-Paiva, M.J.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. (Org.) **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Varela, São Paulo. pp 75-88.

Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M.; Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotox. Environ. Safe.** 64, 178-189.

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.

Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mut. Res.** 631, 36-43.

Veiga, M.M.; Silva, D.M.; Veiga, L.B.E.; Faria, M.V.C., 2006. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública.** 22, 2391-2399.

Velisek, J.; Stara, A.; Kolarova, J.; Svobodova, Z., 2011. Biochemical, physiological and morphological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. **Pestic. Biochem. Physiol.** 100, 305-313.

Vitale, A.M.; Monserrat, J.M.; Castilho, P.; Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comput. Biochem. Physiol.** 122 C, 121-129.

Viveiros, A.T.M.; Nascimento, A.F.; Orfão, A.H.; Isaúa, Z.A., 2010. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology.** 74, 551-556.

Wang, X.; Yin, Z., 1997. Using GIS to assess the relationship between land use and water quality at a watershed level. **Environ. Internat.** 23, 103-14.

Waring, C.P.; Moore, A., 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. **Aquat. Toxicol.** 66, 93–104.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. **Physiol. Rev.** 77, 591-620.

Wiegand, C.; Krause, E.; Steinberg, C.; Pflugmacher, S., 2001. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 49, 199-205.

Wilhelm Filho, D., 2007. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. **Front. Biosci.** 12, 1229-1237.

Willett, K.; Willet, D., 2008. Modelling health-based restrictions on pesticides in groundwater under uncertainty: a policy application. **IMA J. Manag. Math.** 19, 417-435.

Winkaler, E.U.; Santos, T.R.M.; Machado-Neto, J.G.; Martinez, C.B.R., 2007. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 145 C, 236–244.

Xu, B.; Gao, N.; Cheng, H.; Hu, C.; Xia, S.; Sun, X.; Wang, X.; Yang, S., 2009. Ametryn degradation by aqueous chlorine: Kinetics and reaction influence. **J. Hazard. Mater.** 169, 586–592.

Zanella, R.; Primel, E.G.; Gonçalves, F.F.; Martins, M.L.; Adaime, M.B.; Marchesan, E.; L.O. Machado S.L.O., 2008. Study of the degradation of the herbicide clomazone in distilled and in irrigated rice field waters using HPLC-DAD and GC-MS. **J. Braz. Chem. Soc.** 19, 987-995.