



A EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA CLOMAZONE DURANTE 96 H PROMOVE ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NO PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS*

Lindalva Pereira^{1,2}

Marisa N. Fernandes¹ e Cláudia B. R. Martinez²

¹Programa de Pós - Graduação em Ecologia e Recursos Naturais - Universidade Federal de São Carlos/SP, Rod. Washington Luiz; ²Departamento de Ciências Fisiológicas - Universidade Estadual de Londrina/PR., Rod. Celso Garcia Cid. E-mail: lindalvaperreira2@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O herbicida clomazone é muito utilizado no controle pré e pós-emergente de plantas infestantes nas lavouras de cana-de-açúcar e outras culturas. A presença deste herbicida tem sido constatada nas águas em áreas de cultivo de cana-de-açúcar e de arroz (Armas *et al.*, 005; Primel, 2005).

O clomazone pertence ao grupo químico das isoxazolidinonas e age como inibidor da síntese de carotenóides; tem classificação toxicológica III, ou seja, é considerado moderadamente tóxico. Alguns estudos sobre a ação deste herbicida já mostraram que este é tóxico para duas espécies de peixe neotropical, o jundiá, *Rhanda quelen* (Miron, *et al.*, 005; Crestani, *et al.*, 006; Crestani, *et al.*, 007) e a piava, *Leporinus obtusidens* (Moraes *et al.*, 007; Miron, *et al.*, 008). Entretanto, devido à sua ampla e crescente utilização, mais informações sobre a ação desse herbicida em outras espécies de peixes neotropicais são necessárias, uma vez que os corpos d'água estão sujeitos a receberem esse tipo de contaminante.

OBJETIVOS

Este trabalho visou avaliar possíveis alterações hematológicas e bioquímicas de *Prochilodus lineatus*, após exposição aguda a diferentes concentrações subletais do herbicida clomazone.

MATERIAL E MÉTODOS

Jovens de *P. lineatus* foram expostos, durante 96 h, a três concentrações subletais do herbicida clomazone (1, 5 e 10 mg.L⁻¹) ou apenas à água (grupo controle). Após o período experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína

(0,1 g.L⁻¹) e o sangue foi retirado pela veia caudal utilizando seringas plásticas heparinizadas, para análises dos parâmetros sanguíneos. Em seguida, os animais foram sacrificados por secção medular para a retirada do fígado, que foi armazenado a -80°C para as análises enzimáticas.

O sangue coletado foi utilizado para a determinação do hematócrito (Hcto) pelo método de microhematócrito, contagem do número de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer, dosagem do conteúdo de hemoglobina (Hb) pelo método cianometahemoglobina (Kit comercial) e cálculo do volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média (VCM e HCM). O fígado foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 0,1M e centrifugado. O sobrenadante foi utilizado para medir a atividade das enzimas catalase (CAT) pela técnica descrita por Beutler (1975), glutationa-S-transferase (GST) pelo método descrito por Keen *et al.*, 1976 e glutationa peroxidase (GPx) pelo método de Flohé e Gunzler (1984). A análise estatística utilizada foi o teste paramétrico ANOVA seguido por um teste de comparações múltiplas, para a localização das diferenças. Foram considerados significativos valores de P < 0,05.

RESULTADOS

Os peixes expostos ao clomazone apresentaram decréscimo significativo do Hcto (em %) na concentração de 10 mg.L⁻¹ (20,78 ± 3,49) quando comparado ao grupo ctr (26,00 ± 3,49). A Hb (g Hb. dL⁻¹) e o HCM também reduziram significativamente na concentração de 5 e 10 mg.L⁻¹ (33,25 ± 3,53 e 28,92 ± 3,8 respectivamente) com relação ao grupo ctr (46,69 ± 9,42). Como não foi constatada diminuição significativa no RBC nessas concentrações, é possível que tenha ocorrido uma redução no volume e conteúdo de hemoglobina nos eritrócitos. Esses resultados expressam um provável quadro de anemia, pois é sabido que muitos poluentes químicos como os agrotóxicos podem induzir a anemia em

peixes (Min e Kang, 2008). Porém, aumento significativo no número de eritrócitos (RBC) foi constatado na menor concentração (1 mg.L^{-1}). 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.

A GST é um grupo de enzimas envolvidas no processo de detoxificação no organismo. Os resultados observados neste estudo mostram que a GST (em $\text{nmol CDNB conjugado.min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) em teve sua atividade aumentada nos peixes expostos a 5 e 10 mg.L^{-1} de clomazone ($70, 89 \pm 14,89$; $71,58 \pm 15,33$ respectivamente) com relação ao grupo ctr ($29,32 \pm 4,40$). O aumento da atividade da GST tem sido associado com uma adaptação defensiva do organismo contra uma variedade de compostos orgânicos presentes no ambiente (Van der Oost *et al.*, 003). A CAT e a GPx são importantes enzimas antioxidantes. A CAT atua especificamente na eliminação do H_2O_2 , produzindo O_2 e H_2O , enquanto a GPx age sobre uma variedade de hidroperóxidos, entre eles o H_2O_2 . No presente estudo ocorreu um aumento da atividade da CAT (em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ metabolizado. $\text{min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) nas concentrações de 5 e 10 mg.L^{-1} de clomazone ($49,82 \pm 7,54$; $61,50 \pm 15,52$ respectivamente) em comparação ao grupo ctr ($26,69 \pm 2,89$). Esses resultados indicam intensa produção de H_2O_2 , provavelmente proveniente da metabolização do herbicida, como uma proteção do organismo contra danos oxidativos. Houve redução na atividade hepática da GPx ($\mu\text{mol NADPH oxidado. min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$) nos peixes expostos a concentração de 10 mg.L^{-1} de clomazone ($26,30 \pm 7, 27$), comparado com o grupo ctr ($40, 37 \pm 8,17$). Esse resultado pode ser devido à competição entre GPx e CAT pelo mesmo substrato (H_2O_2) uma vez que ambas atuam na conversão do peróxido de hidrogênio em água (Dröge, 2002) ou mais provavelmente, devido a um esgotamento do substrato GSH, que está sendo utilizado nas reações de conjugação catalizadas pela GST.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o clomazone promove alterações hematológicas e bioquímicas que podem comprometer a saúde do peixe, *P. lineatus*. Além disso, esses biomarcadores apresentam potencial para serem utilizados em programas de biomonitoramento ambiental.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Pós - graduação da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR); ao Laboratório de Ecofisiologia Animal da Universidade Estadual de Londrina (LEFA-UDEL); a Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes e a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- 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. *Química Nova*, 28 (6) : 975 - 982.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. Grune & Stratton, New York.
- 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.
- Crestani, M.; Menezes, C.; Gluszczak, L.; Miron, D. S.; Lazari, 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*. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 65: 48 - 55.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82: 47 - 95.
- Flohé I., Gunzler, W.A. 1984 Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 105:114-121
- 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.
- Min, E. Y.; Kang, J. C., 2008. Effect of waterborne beromyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 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.; Baldissaroto, 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). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 398 - 403.
- 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.
- 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. *Química Nova*, 28 (4): 605 a 609.
- Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57 - 149.