



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL
E SAUDE PÚBLICA NOS TRÓPICOS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA - EMVZ

LAIZA PEREIRA LACERDA VIEIRA

TOXICIDADE DO HERBICIDA PARAQUAT EM *Colossoma macropomum*
(CUVIER, 1818)

ARAGUAÍNA (TO)
2018

LAIZA PEREIRA LACERDA VIEIRA

**TOXICIDADE DO HERBICIDA PARAQUAT EM *Colossoma macropomum*
(CUVIER, 1818)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Estevan Moron

ARAGUAÍNA (TO)
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

V658t Vieira, Laiza Pereira Lacerda .
 TOXICIDADE DO HERBICIDA PARAQUAT EM *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818). / Laiza Pereira Lacerda Vieira. – Araguaína, TO, 2018.
 81 f.

 Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2018.
 Orientador: Sandro Estevan Moron

 1. Agrotóxico. 2. Ecotoxicologia. 3. Teleósteo. 4. Tambaqui. I.
Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LAIZA PEREIRA LACERDA VIEIRA

**TOXICIDADE DO HERBICIDA PARAQUAT EM *Colossoma macropomum*
(CUVIER, 1818)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública.

Data da aprovação: 09 / 03 / 2018.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Sandro Estevan Moron. Orientador, UFT



Prof. Dr. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes. Examinador, UFT



Dr. Fabrício Pereira Rezende. Examinador, EMBRAPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado proteção, sabedoria, direcionamento em tudo o que eu precisava.

À minha família pelo apoio e compreensão, meus pais Luis e Maria, meus irmãos Samuel e Isidoro,

A meu esposo Christopher, pela paciência e compreensão que sempre teve e pelo apoio que me dedicou diariamente.

Agradeço a meu orientador, Professor Dr. Sandro Estevan Moron pelo apoio, paciência e desenvolvimento do projeto.

A todos os meus amigos do Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais– UFT/Araguaína que me ajudaram durante os experimentos, sendo eles: Vanessa, Bárbara, Jhonas, David, Eduardo, Nádia e Mayara. Às técnicas do Laboratório Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais – UFT / Araguaína, Liana e Gilzelle, por sempre me ajudarem no que era preciso.

A CAPES pela bolsa de pesquisa.

À Universidade Federal do Tocantins por ter dado condições da realização desta pesquisa.

Muito obrigada!!!

*“Sendo eu, um aprendiz
A vida já me ensinou
que besta é quem vive
triste
Lembrando o que faltou
Magoando a cicatriz
E esquece de ser feliz
Por tudo que conquistou.”*

Braulio Bessa.

RESUMO

O estudo ecotoxicológico de qualquer pesticida utilizado no ambiente é fundamental para o processo de regulamentação e a classificação quanto ao potencial de risco ambiental. No ambiente aquático, os agrotóxicos podem alterar as variáveis físico-químicas da água ou ser tóxica a biota, podendo interferir nas funções essenciais deste ecossistema através da redução na diversidade de espécies. O paraquat é utilizado para o controle de plantas daninhas terrestres e sua presença é relatada em muitas fontes de água do mundo, sendo bastante utilizado na agricultura brasileira. Assim, investigar a toxicidade deste herbicida em peixes nativos, utilizando testes de toxicidade, é importante para avaliar os possíveis danos que o xenobiótico pode causar. O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito da exposição do tambaqui ao herbicida paraquat por 96 horas (determinando a CL_{50-96H}), potencial genotóxico, parâmetros hematológicos e bioquímicos, integridade histológica da brânquia, fígado e rim nas concentrações: controle, 10 mg.L^{-1} , 15 mg.L^{-1} , 20 mg.L^{-1} e 25 mg.L^{-1} , e em 7 e 15 dias sem exposição ao paraquat (controle, 10 mg.L^{-1} , 15 mg.L^{-1}). A CL_{50-96H} determinada para o tambaqui foi 26, 66 mg.L^{-1} . O herbicida causou genotoxicidade (frequência de micronúcleos e anomalias nucleares) nos animais expostos por 96 horas e nas recuperações por 7 e 15 dias. Constatou alterações nos parâmetros hematológicos e no glicogênio dos tambaquis expostos e mesmo após o período sem exposição ao paraquat, verificou-se que os animais não reverteram os danos causados pelo herbicida. Observou-se também que o herbicida causa diversos danos histológicos nas brânquias (aneurisma, edema, hipertrofia celular, hiperplasia), fígado (hipertrofia celular, degeneração nuclear, estagnação biliar, entre outras) e rim (aumento do lumen tubular, degeneração tubular, obstrução do lumen tubular) dos animais expostos por 96 horas, e mesmo após os períodos de recuperação estas alterações permanecem.

Palavras-chave: agrotóxico, ecotoxicologia, teleósteo, tambaqui.

ABSTRACT

The ecotoxicological study of any pesticide used in the environment is fundamental to the regulatory process and classification as to environmental risk potential. In the aquatic environment, agrochemicals can alter the physico-chemical variables of the water or be toxic to biota, and may interfere with the essential functions of this ecosystem through the reduction of species diversity. Paraquat is used for the control of terrestrial weeds and its presence is reported in many sources of water in the world, being widely used in Brazilian agriculture. Thus, investigating the toxicity of this herbicide in native fish, using toxicity tests, is important to evaluate the possible damages that the xenobiotic can cause. The objective of this work was to evaluate the effect of exposure of tambaqui to the herbicide paraquat for 96 hours (determining CL_{50-96H}), genotoxic potential, hematological and biochemical parameters, histological integrity of the gill, liver and kidney in the concentrations: control, 10 mg L^{-1} , 15 mg.L^{-1} , 20 mg.L^{-1} and 25 mg.L^{-1} , and at 7 and 15 days without exposure to paraquat (control, 10 mg.L^{-1} , 15 mg.L^{-1}). The herbicide caused genotoxicity (frequency of micronuclei and nuclear abnormalities) in exposed animals for 96 hours and in recoveries for 7 and 15 days. It was observed that the herbicide caused several histological damages in the gills (aneurysm), and it was observed that the herbicide did not reverse the damage caused by the herbicide. edema, cellular hypertrophy, hyperplasia), liver (cellular hypertrophy, nuclear degeneration, biliary stagnation, among others) and kidney (tubular lumen enlargement, tubular degeneration, tubular lumen obstruction) of exposed animals for 96 hours, and even after these changes remain.

Key-words: agrototoxic, ecotoxicology, teleosteo, tambaqui.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 1

- Figura 1 Fórmula estrutural do herbicida Paraquat (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2007)21
- Figura 2 Juvenil de tabaqui. Fonte: Laiza P. Lacerda Vieira.....22
- Figura 3 Formação de micronúcleo em célula mononucleada (Fonte: TERRADAS et al, 2010).....24

CAPITULO 2

- Figura 1 Representação da relação mortalidade–concentração de paraquat para o tabaqui durante a determinação da CL_{50-96H}.....44
- Figura 2 Fotomicrografia dos eritrócitos do tabaqui, ilustrando eritrócitos normais, os micronúcleos e anomalias nucleares. Em (A) Eritrócitos normais (E), Grupo controle; (B) eritrócito com micronúcleo (setas), exposição por 96 horas; (C) eritrócitos com MN (asterisco), eritrócitos com núcleo *Notched* (seta), eritrócitos com núcleo *Blebbbed* (cabeça de seta) exposição por 96 e recuperação 7 dias; (D) eritrócitos *binucleados* (setas), eritrócitos com núcleo *Lobed* (cabeça de seta), exposição por 96 e recuperação 15 dias. Coloração: Giemsa 5%. Aumento de 1000x.....46

CAPITULO 3

- Figura 1 Valores médios do IAH e VMA nas brânquias do tabaqui exposto ao herbicida paraquat. Exposição por 96 horas, exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias e exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias. Dados são as médias \pm erro padrão. Considerou-se diferença significativa $p < 0,05$, teste Dunnet. (*) diferença significativa em relação ao controle.....64
- Figura 2 Alterações histopatológicas mais frequentes nas brânquias do tabaqui expostos ao herbicida Paraquat. (A) grupo controle, filamento branquial sem alterações – lamela secundária (seta LS) e lamela primária (seta LP); (B) exposição 96 horas e recuperação por 15 dias, descolamento epitelial das lamelas (setas) edema (asterisco); (C e D) exposição por 96 horas, aneurisma (seta) hiperplasia celular (cabeça de seta); (E) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, Hipertrofia; (F) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, hiperplasia das células da lamela secundária. Coloração HE. Barra em μm66
- Figura 3 Valores médios do IAH e VMA no fígado do tabaqui exposto ao herbicida paraquat. Exposição por 96 horas, exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias e exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias. Dados são as médias \pm erro padrão. Considerou-se diferença significativa $p < 0,05$. (*) diferença significativa em relação ao controle.....70

Figura 4 Alterações histopatológicas mais frequentes no fígado do tambaqui expostos ao herbicida Paraquat. (A) grupo controle, arranjo cordonal dos hepatócitos (traço), sinusóides (setas), hepatócitos (área circular), célula de Kupffer (cabeça de seta). (B) grupo controle, hepatócitos (área quadricular), célula de Kupffer (seta); (C) exposição por 96 horas, vacuolização citoplasmática (seta branca), estagnação biliar (setas), ausência de núcleo (cabeça de seta); (D) exposição por 96 horas, degeneração nuclear (seta branca) estagnação biliar (seta); (E) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, hipertrofia celular (seta), vacuolização citoplasmática (asterisco); (F) exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias, estagnação biliar (seta), vacuolização citoplasmática (asterisco), núcleo na periferia da célula (seta branca). Coloração HE. Barra em μm72

Figura 5 Valores médios do IAH e VMA rim do tambaqui exposto ao herbicida paraquat. Exposição por 96 horas, exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias e exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias. Dados são as médias \pm erro padrão. Considerou-se diferença significativa $p < 0, 05$. (*) diferença significativa em relação ao controle.....75

Figura 6 Alterações histopatológicas mais frequentes no rim do tambaqui expostos ao herbicida Paraquat. (A) grupo controle, túbulo distal (TD) e túbulo proximal; (B) exposição por 96 horas, hipertrofia da célula tubular (seta), obstrução do lúmen tubular (cabeça de seta) e degeneração nuclear da célula tubular (seta branca); (C) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, aumento do lúmen tubular (asterisco), núcleo picnótico (seta) e desorganização tubular (área circular); (D) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, novos néfrons (seta branca); (E) exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias, degeneração tubular (seta branca) e novos néfrons (seta); (F) exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias, aumento do lúmen tubular (seta branca), degeneração nuclear da célula tubular (seta) e obstrução tubular (asterisco). Coloração HE. Barra em μm77

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

Tabela 1 Valores das variáveis físico-químicas da água (média ± SD) no teste de toxicidade aguda em tabaqui exposto ao herbicida paraquat.....	43
Tabela 2 Micronúcleo e anomalias nucleares (média ± SD) após exposição do tabaqui por 96 horas de exposição ao herbicida paraquat (controle, 10 mg.L ⁻¹ , 15 mg.L ⁻¹ , 20 mg.L ⁻¹ e 25 mg.L ⁻¹).....	47
Tabela 3 Micronúcleo e anomalias nucleares (média ± SD) após exposição do tabaqui 96 horas de exposição do tabaqui ao herbicida paraquat e recuperação 7 dias.....	47
Tabela 4 Micronúcleo e anomalias nucleares (média ± SD) após exposição do tabaqui 96 horas de exposição do tabaqui ao herbicida paraquat e recuperação 15 dias.....	47
Tabela 5 Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos do tabaqui exposto por 96 horas de ao herbicida Paraquat (média ± SD)	49
Tabela 6 Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos do tabaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias ao herbicida Paraquat (média ± SD)	49
Tabela 7 Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos do tabaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias ao herbicida Paraquat (média ± SD)	49
Tabela 8 Leucócitos do tabaqui após exposição por 96 horas ao herbicida Paraquat (média ± SD).....	50
Tabela 9 Leucócitos do tabaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias após exposição ao herbicida Paraquat (média ± SD)	50
Tabela 10 Leucócitos do tabaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias após exposição ao herbicida Paraquat (média ± SD)	50
Tabela 11 Glicogênio hepático, glicogênio muscular e glicose do tabaqui após exposição por 96 horas ao herbicida Paraquat (média ± SD)	52
Tabela 12 Glicogênio hepático, glicogênio muscular e glicose do tabaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias após exposição por 96 horas ao herbicida Paraquat (média ± SD)	52
Tabela 13 Glicogênio hepático, glicogênio muscular e glicose do tabaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias após exposição por 96 horas ao herbicida Paraquat (média ± SD)	52

CAPITULO 3

Tabela 1 Frequência das alterações histopatológicas nas brânquias do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat.	62
Tabela 2 Frequência das alterações histopatológicas nas brânquias de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 7 dias.....	62
Tabela 3 Frequência das alterações histopatológicas nas brânquias de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 15 dias.	62
Tabela 4 Frequência das alterações histopatológicas no fígado de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat.	67
Tabela 5 Frequência das alterações histopatológicas no fígado de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 7 dias.....	67
Tabela 6 Frequência das alterações histopatológicas no fígado de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 15 dias.....	68
Tabela 7 Frequência das alterações histopatológicas no rim de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat.....	73
Tabela 8 Frequência das alterações histopatológicas no rim de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 7 dias.....	73
Tabela 9 Frequência das alterações histopatológicas no rim de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 15 dias.....	74

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

Bs – Basófilo

°C – Grau Célsio

cm – centímetros

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CL – Concentração Letal

CaCO₃ – Carbonato de Cálcio

dL – decilitro

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

fL – Fentolitro

g – grama

g.dL⁻¹ – gramas por decilitro

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

IAH – índice de alteração histopatológica

Hb – Hemoglobina

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HCT – hematócrito

K₂SO₄ – sulfato de potássio

KCN – cianeto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio

KOH6N – hidróxido de potássio

K₃[Fe(CN)₆] – Ferrocianeto de potássio

L – litros

Lf – linfócitos

LG – PAS – leucócito granular PAS positivo

Lt – comprimento em cm

Lts – Leucócitos totais

mg – miligramas

mg.L⁻¹ – miligramas por litro

mL – mililitros

MN - micronúcleo

Mt - monócito

n – número

nm – nanômetros

Nt – neutrófilo

O₂ – oxigênio

pg – picograma

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – partículas por milhões

RBC – contagem total de eritrócitos

V – Versão

VCM – volume corpuscular médio

VMA – valor médio de alterações

Wt – peso em gramas

μL – microlitro

SUMÁRIO

CAPITULO 1	17
1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 O herbicida Paraquat	19
2.2 Escolha da espécie	21
2.3 Testes de toxicidade	22
2.4 Genotoxicidade	22
2.5 Parâmetros hematológicos	24
2.6 Glicose e Glicogênio	24
2.7 Histopatologia causada por pesticidas.....	25
2.7.1 As brônquias.....	25
2.7.2 Fígado.....	25
2.7.3 Rim	26
3 REFERENCIAS.....	28
CAPITULO 2	36
EFEITOS TÓXICOS E GENOTÓXICO DO HERBICIDA PARAQUAT NO TAMBAQUI	36
RESUMO.....	36
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1 Teste de Toxicidade Aguda	39
2.2 Exposição sub-letal do tabaqui ao Paraquat e posterior recuperação de 7 e 15 dias.	40
2.3 Micronúcleo e anomalias nucleares	40
2.4 Hematologia.....	41
2.5 Glicogênio	41
2.6 Glicose	42
2.7 Análises estatísticas.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1 Parâmetros de qualidade da água	42
3.2 Concentração letal média	43
3.3 Micronúcleo e anomalias nucleares	44
3.4 Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos	47

3.5 Glicogênio e Glicose	50
4 CONCLUSÃO.....	52
5 REFERÊNCIAS.....	53
CAPITULO 3	56
HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO, BRÂNQUIA E RIM DO TAMBAQUI APÓS EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA PARAQUAT	56
RESUMO.....	56
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.1 Histopatologia das brânquias, fígado e rim	59
2.2 Análises Estatísticas	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1 Brânquias.....	60
3.2 Fígado.....	66
3.3 Rim.....	72
4 CONCLUSÃO.....	77
5 REFERÊNCIAS.....	78

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura vem sendo praticada pela humanidade há mais de dez mil anos, já o uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças nas plantações existe há pouco mais de meio século. Diversas políticas foram implementadas em todo o mundo para expandir e assegurar este mercado. O campo de pesquisa agropecuária voltou-se então para o desenvolvimento de sementes selecionadas visando responder a aplicações de adubos químicos e agrotóxicos em sistemas de monoculturas altamente mecanizados. Segundo seus promotores, esta “Revolução Verde” seria fundamental para derrotar a fome que assolava boa parte da população mundial (LONDRES, 2011).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MME, 2017) o Brasil é um dos maiores consumidores de produtos agrotóxicos no mundo e são considerados extremamente relevantes no modelo de desenvolvimento da agricultura no País. Porém uso exagerado de agrotóxicos e a não utilização de práticas conservacionistas comprometem a qualidade do solo, das águas superficiais e subterrâneas, acarretando graves impactos ao meio ambiente e à saúde humana (CARNEIRO et al., 2012; IBGE, 2017).

O peixe *Colossoma macropomum* (tambaqui) é uma espécie nativa da fauna brasileira e bastante apreciada na Região Amazônica, possui também grande destaque na piscicultura continental em todo o Brasil, e é uma das principais espécies nativa cultivada no país (MENEZES et al., 2008; LOBO et al., 2015). A espécie é considerada um peixe de grande porte podendo alcançar 1 metro de comprimento e podendo pesar 30 kg (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998; ARAÚJO-LIMA; GOMES, 2005) sendo bastante utilizada em estudos toxicológicos (CASANOVA, 2008; SILVA et al., 2010).

O estudo ecotoxicológico de qualquer pesticida a ser utilizado no ambiente é fundamental para o processo de regulamentação e a classificação quanto ao potencial de risco ambiental. A identificação do perigo e a avaliação da relação concentração-resposta são etapas iniciais neste processo, sendo assim, os estudos de toxicidade aguda são importantes na estimativa do risco ambiental (USEPA, 2002; PARMA de CROUX et al., 2002).

No ambiente aquático, os agrotóxicos podem alterar as variáveis físico-químicas da água, ou ser tóxica a biota, podendo interferir nas funções essenciais deste ecossistema através da redução na diversidade de espécies. Os peixes podem entrar em contato com moléculas nocivas que possam estar presentes no ambiente aquático por quatro vias: através da alimentação, ingestão de água, pela pele e/ou das brânquias (HEATH, 1995). Como consequência, pode causar diversos prejuízos ambientais, impactando desde moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos e até em comunidades (GRISOLIA, 2005).

O Paraquat é um herbicida pós-emergente utilizado no controle de ervas daninhas em diversas culturas, principalmente de soja, café, abacaxi. E vem sendo motivo de diversos debates a respeito de sua utilização no Brasil, devido ao seu potencial tóxico e principalmente por não possuir antídotos em casos de intoxicação, além disso, são poucas as pesquisas que relacionem os possíveis impactos ambientais que este agrotóxico pode causar em espécies nativas (MAPA, 2017).

Neste contexto, é essencial o estudo dos possíveis danos a saúde que os agrotóxicos, como o herbicida paraquat, podem causar a organismos não-alvos, além de contribuir nos processos de registros dos mesmos, assim como auxiliar na determinação dos limites aceitáveis de determinado agrotóxico no meio ambiente, na tentativa de minimizados riscos a poluição ambiental.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A crescente demanda pela produção de alimentos no mundo e, conseqüentemente de maiores áreas para cultivo, tem-se a necessidade da utilização de mecanismos para potencializar a atividade agrícola, tais como a utilização de pesticidas para controle de pragas que afetam as plantações (JURADO et al., 2011). Os herbicidas são bastante utilizados na agricultura no controle de ervas daninhas, sendo produtos químicos que podem fixar-se nos locais de aplicação, ou ainda, ser lixiviados para as águas superficiais, comprometendo a qualidade deste ambiente e dos animais que dela dependem (AMARANTE JR.; BRITO et al., 2002).

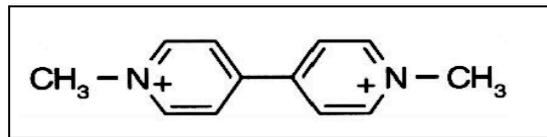
O estudo das respostas iniciais de animais expostos a contaminantes ambientais pode ajudar a compreender e prevenir os efeitos nocivos que poderiam ocorrer em nível de organização biológica (OOST et al., 2003). Estas respostas são chamadas de biomarcadores e podem ser avaliadas em organismos não-alvos, podendo fornecer subsídios para a regulamentação do uso de produtos químicos no ambiente (MORAES, 2013).

Os biomarcadores podem ser definidos como variações induzidas por xenobióticos em componentes ou processos celulares e bioquímicos, estruturas ou funções que possam ser mensuráveis em um sistema biológico, eles precedem alterações em níveis populacionais e podem ser considerados sinais antecipados de alerta na análise da qualidade do meio ambiente (SHUGART et al. 1992; TORRE et al., 2007).

2.1 O herbicida Paraquat

O herbicida paraquat (1,1'-dimethyl- 4,4'-bipyridinium, fórmula bruta: $C_{12}H_{14}N_2$) é um sal solúvel em água que desseca rapidamente o tecido verde que entra em contato, é amplamente utilizado na agricultura, não é inflamável ou explosivo em solução aquosa, não sendo volátil (PERON et al., 2003) (figura 1).

Figura 1- Fórmula estrutural do herbicida Paraquat. Fonte: ANVISA, 2007.



O Paraquat é utilizado para o controle de plantas daninhas em diferentes países e sua presença é relatada em muitas fontes de água do mundo (FILIZADEH, 2002; YE et al., 2002; GAO et al., 2010; ISMAIL et al., 2011). A aplicação do herbicida é realizada na pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, algodão, arroz, banana, batata, café, cana-de-açúcar, milho, feijão, maçã, soja, trigo e uva e como dessecante da cultura de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, milho e soja (ANVISA, 2007).

É uma molécula aceptora de elétrons, que em plantas expostas a luz leva a prejuízos fisiológicos, com depleção de NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) e inibição da fixação de CO₂, com conseqüente produção de superóxidos, os quais promovem a destruição de membranas (MARTINS, 2013). O Paraquat age na presença de luz, desidratando as partes verdes de todas as plantas com as quais entra em contato, após a aplicação a penetração ocorre quase imediatamente (CENTRO, 2017).

Algumas pesquisas relatam que o Paraquat pode estar relacionado com a Doença de Parkinson, testes realizados em camundongos constataram que estes animais apresentaram sintomas patológicos semelhantes da doença de Parkinson após exposição ao herbicida, incluindo deposição intraneural de proteínas e a degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos, gerando disfunções motoras como tremores de repouso e instabilidade postural (KATHTEEN; MAGUIRE-ZEISS, 2008).

Segundo a bula do paraquat este produto é altamente tóxico para o ambiente aquático. Banaee et al. (2013) relatam que o contato do peixe com o paraquat pode causar diversos distúrbios a níveis bioquímicos, celulares, mudança dos fatores sanguíneos, estresse oxidativo e lesão tecidual.

Assim, investigar a toxicidade deste herbicida em espécies de peixes nativos, como uma das espécies não-alvo, é uma necessidade para monitorar e avaliar os possíveis danos que o herbicida pode causar ao meio ambiente.

2.2 Escolha da espécie

Para o presente estudo foram utilizados peixes da espécie *Colossoma macropomum*, popularmente conhecidos como tambaqui, pertencente à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Serrassalmidae (BUCKUP et al., 2007; GOMES et al., 2010). É conhecida por outros nomes populares como cachama na Venezuela e Colômbia, e gamitama no Peru, no rio Amazonas, o tambaqui é comumente encontrado da foz do rio Xingu, no estado do Pará, até o Médio rio Ucaiali, no Peru (ARAÚJO-LIMA; GOULDING 1998; BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

O tambaqui (figura 2) possui dentes molariformes bastante robustos o que lhe favorece alimentar-se tanto de zooplâncton quanto de frutos e sementes que caem na água no período de cheia dos rios (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998; ABELHA et al., 2001; SANTOS et al., 2006). No ambiente natural o tambaqui é onívoro com tendência a zooplanctófago, na fase jovem, e frugívoro exclusivo na fase adulta (SAINT-PAUL, 1984).

Figura 2 - Juvenil de tambaqui. Fonte: autor



O tambaqui é uma espécie bastante utilizada em testes de toxicidade, cuja resposta a diversos tipos de estressores é conhecida, tendo demonstrado sensibilidade a vários xenobiontes, apresenta fácil manutenção em laboratório e aquisição de alevinos (SANTOS et al., 2006).

Alguns experimentos que utilizaram o tabaqui indicaram que essa espécie não é apenas importante na pesca e aquicultura, mas também um modelo experimental adequado para o monitoramento da poluição de ecossistemas aquáticos, tendo sido comumente utilizado como espécie-modelo para o entendimento de processos fisiológicos modulados por variáveis ambientais (CASANOVA, 2008; SILVA et al., 2010).

2.3 Testes de toxicidade

Os peixes são importantes vertebrados aquáticos utilizados em testes de toxicidade (ALBINATE et al., 2009; HENARES et al., 2008; SALAZAR-LUGO et al., 2009; MA et al., 2014), por serem animais sensíveis a alterações ambientais.

Os testes de toxicidade aguda têm sido utilizados para avaliação da potencialidade tóxica de moléculas em espécies não padronizadas. Estes estudos se baseiam na relação existente entre os efeitos biológicos observáveis e a concentração do produto tóxico no ambiente (CONNELL, 1997). Geralmente são realizados de 24 a 96 horas, onde o sistema de condução dos testes poderão ser o estático, semi-estático ou de fluxo contínuo (LOPES, 2005). Este método proporciona resposta rápida em estudos sobre efeitos tóxicos letais, e objetiva-se determinar a concentração Média Letal (CL₅₀) de uma substância sobre algum organismo experimental (COSTA et al., 2008).

2.4 Genotoxicidade

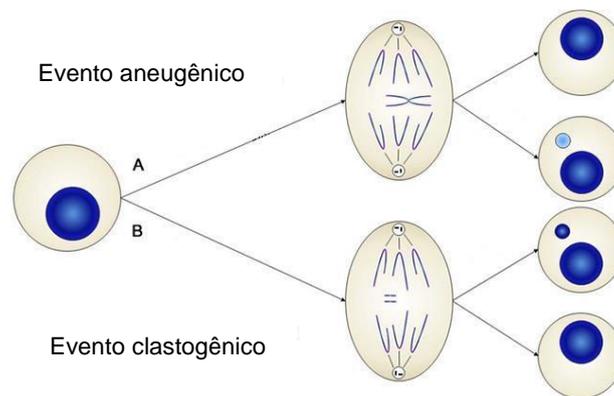
Os agentes genotóxicos são aqueles capazes de interagir com o DNA alterando sua estrutura ou função, e quando estas alterações se fixam de forma a poderem ser transmitidas a gerações seguintes, denominam-se mutações. Estas mutações não são sempre positivas a população, podendo causar doenças tanto para os indivíduos, quanto a seus descendentes, aumentando a incidência de câncer, doenças hereditárias e neurocomportamentais, assim como efeitos negativos a biodiversidade (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2006).

O teste de micronúcleo que foi inicialmente desenvolvido por Schmid (1975), é recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, especialmente por sua capacidade de detectar tanto agentes clastogênicos (quebra de cromossomos),

quanto agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003). Também por se tratar de um método simples, confiável, sensível e de baixo custo para analisar impacto biológico de ambientes aquáticos poluídos (RUSSO et al., 2004), portanto, pode detectar a genotoxicidade de uma ampla gama de compostos (HEDDLE et al., 1991).

Os micronúcleos (Figura 3) são estruturas citoplasmáticas encontradas em populações celulares em divisão. Surgem quando cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos não são incorporados às células filhas durante o processo de divisão celular. Sua formação pode ocorrer devido a vários mecanismos como formação de fragmentos de cromossomos acêntricos, cromossomos multicêntricos, danos no cinetócoro e defeitos nas fibras de fuso (MÜLLER et al., 1996; UDROIU, 2006; VICARI, 2009).

Figura 3 - Formação de micronúcleo em célula mononucleada. Fonte: Terradas et al. (2010).



Além da formação dos micronúcleos, podem ocorrer outras anomalias celulares, que se formam quando determinada quantidade de material fica levemente atrasada na mitose fazendo com que o núcleo não seja oval, apresentando uma saliência de cromatina (BOMBAIL et al., 2001). Carrasco et al. (1990) descreveram as alterações morfológicas encontradas em núcleos de eritrócitos de peixes em: **Blebbbed**: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina (mais escuro); **Lobed**: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *blebbbed*; **Notched**: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma; **Células binucleadas**, contendo dois núcleos de tamanhos iguais.

Os micronúcleos representam perda de cromatina em consequência de algum dano cromossômico estrutural (fragmento) ou numérico (cromossomo inteiro) ou

ainda dano no aparelho mitótico, sua presença é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos podem aumentar a frequência nas células (SALVADORI *et al.*, 2003).

2.5 Parâmetros hematológicos

A hematologia é uma das partes essenciais da toxicologia, onde todas as ciências podem ser associadas e estimadas para determinar os possíveis riscos para a saúde animal e para o ambiente (EVANS, 2008). Os parâmetros hematológicos são biomarcadores úteis e sensíveis ao diagnóstico de doenças e monitoramento fisiológico de peixes expostos a agentes tóxicos, pois podem disponibilizar diversas informações acerca das respostas fisiológicas dos peixes a estressores ambientais (ZHANG *et al.*, 2007; ELAHEE; BHAGWANT, 2007).

A avaliação dos parâmetros hematológicos pode ser favorável no monitoramento do nível de saúde dos peixes, visto que sua interpretação é importante em relação aos fatores intrínsecos e extrínsecos que podem influenciar as células e os valores quantitativos obtidos (CLAUSS *et al.*, 2008).

2.6 Glicose e Glicogênio

Os estressores físicos e químicos podem causar diversas respostas não específicas nos peixes, podendo ser consideradas adaptativas, visando capacitar o animal a lidar com as perturbações do meio ambiente (BARTON, 2002). Wendelaar Bonga (2008), afirma que os estressores induzem padrões típicos de ativação no cérebro e no sistema endócrino, aumentando a atividade cardíaca e respiratória, seguidas por estímulo da mobilização energética.

Venturini (2010) relata que a exposição de peixes a pesticidas pode levar a uma redução dos níveis de glicogênio e glicose, ocasionando um aumento no requerimento das fontes energéticas dos peixes expostos na tentativa de manter os processos homeostáticos.

2.7 Histopatologia causada por pesticidas

As análises histopatológicas são sensíveis para detectar efeitos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo, como brânquias, fígado e rim (MAHARAJAN et al., 2012; BENZE, 2013), uma vez que as análises microscópicas permitem considerar semi-quantitativamente as lesões histopatológicas, possibilitando, relacionar os danos encontrados com alterações em outros tipos de biomarcadores em peixes (SCHWAIGER et al., 1997).

2.7.1 As brânquias

As brânquias atuam como um órgão multifuncional que está diretamente envolvido nas trocas de gases respiratórios (O_2/CO_2), regulação iônica e osmótica, no equilíbrio ácido-base, na excreção de produtos nitrogenados e metabolismo de xenobióticos (FERNANDES; MORON, 2014).

O fato de este órgão funcionar como uma barreira entre o meio externo e interno faz com que a morfologia branquial passe por constantes modificações durante a adaptação do peixe às alterações ambientais. As brânquias atuam como órgão alvo dos peixes para os poluentes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma extensa área superficial (FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011).

2.7.2 Fígado

O fígado na maioria dos peixes teleósteos é composto por dois lobos, o lobo direito que está ao lado da vesícula biliar, e o lobo esquerdo próximo ao baço. As células que o constituem são os hepatócitos, células epiteliais dos ductos biliares, macrófagos, células sanguíneas e as células endoteliais. Os hepatócitos são as principais células do fígado, são poliédricas com um ou dois núcleos grandes, esféricos e centralmente localizados, com nucléolo evidente, e o citoplasma com granulações e aspecto vacuolizado. O citoplasma das células hepáticas apresenta aspecto variável, dependendo do estado nutricional do indivíduo. (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

As principais funções do fígado são: conversão de alimentos, estoque de glicogênio, remoção e metabolismo de substâncias químicas estranhas no sangue, formação da bile, síntese de proteínas plasmáticas, síntese do colesterol utilizado nos hormônios e membranas celulares, produção de secreções exócrinas e metabolismo de hormônios (HEATH, 1995). É um órgão fundamental para o metabolismo quando se considera a ação dos poluentes químicos sobre o peixe, sendo o principal órgão na biotransformação e excreção dos xenobióticos (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

Deste modo, muitos compostos químicos como os agrotóxicos podem se acumular no fígado, de modo que suas células ficam expostas aos agentes químicos presentes no meio ambiente, alterando e comprometendo as funções hepáticas normais (HEATH, 1995) e, conseqüentemente afetando a saúde dos animais expostos (BENZE, 2013; BOTELHO, 2013).

2.7.3 Rim

Em peixes de água doce a principal função do rim é a excreção de uma grande quantidade de urina diluída. Assim, a urina dos peixes dulcícolas é abundante e com baixa concentração de eletrólitos (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Por receber grande fluxo sanguíneo o rim pode ser considerado, tal como as brânquias, órgão alvo para os poluentes (HINTON et al., 1992; EVANS, 1993).

O rim dos peixes teleósteos localiza-se dorsalmente, junto da coluna vertebral, é dividido em duas porções: rim cefálico ou a porção anterior e a porção posterior. A porção anterior do rim é homóloga a adrenal de mamíferos e apresenta dois tipos especiais de células, as células interenais e as células cromafins. A porção posterior do rim dos teleósteos, em associação com as brânquias e intestino, realiza a excreção e a manutenção da homeostase dos fluídos corporais (EVANS, 1993).

Os rins compõem a principal rota de excreção para os metabólitos de vários xenobióticos os quais o peixe tenha sido eventualmente exposto (HINTON et al., 1992), elimina produtos químicos durante o curso de formação da urina, alguns através da filtração glomerular, outros por reabsorção ou pelos processos de secreção tubular (JOBBLING, 1995; EVANS, 1993).

Muitos xenobióticos presentes no sangue seriam pequenos o suficiente para ser removidos pela filtração glomerular, porém estas substâncias químicas podem estar ligadas às proteínas plasmáticas, reduzindo assim o processo de eliminação por este caminho, pois as proteínas plasmáticas são retidas no glomérulo. Assim, a excreção pela urina de muitos compostos químicos é impedida pela afinidade as proteínas (SPACIE; HAMELINK, 1985). Lesões no tecido renal podem ser indicações de toxinas específicas e assim podem ser utilizados como indicadores para o monitoramento de efeitos de contaminantes (HINTON; LAURÉN, 1990; SCHWAIGER et al., 1997).

3. REFERENCIAS

ABELHA, M. C. F.; AGOSTINHO, A. A.; GOULART, E. Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 02, p. 425-434, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (ANVISA-BRASIL). **Consulta pública n. 60, de 26 de junho de 2007**. Disponível em: <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[18968-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[18968-1-0].PDF)> Acesso em: 10 out. 2017.

ALBINATE, A.C.L., MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; DE LIRA A.D.; SANTOS, G.B.; VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, São José dos Campos – SP, p. 327-621, junho de 2009.

AMARANTE JR., O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v.25, n. 04 p.589-593, 2002.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; E GOMES, L. de C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDESSEROTTO, Bernardo; GOMES, Levi de Carvalho. (Org.) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora Da UFSM, p. 468. 2005.

ARAÚJO-LIMA, C. e GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Tefé, AM: Sociedade Civil de Mamirauá, Brasília: CNPq, p. 186, 1998.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria. Ed. UFSM, p. 608, 2005.

BANAEE, M., DAVOODI, M.H., ZOHEIRI F. Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). **Open Veterinary Journal**, Vol. 3, p. 36-42, 2013.

BARTON, B. A. Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**. V. 42, p. 517-525, julho de 2002.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. A. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional. v. 1, 2007, p. 195.

- BENZE, T. P. **Efeitos da exposição ao inseticida difluzenzuron em curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilodontidae)**. 2013. 71f. Dissertação - Mestrado (Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais), Centro de Ciências Biológicas e Saúde – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2013.
- BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v.44, p.383-392, junho de 2001.
- BOTELHO, R. G. **Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba (SP) e efeito da vinhaça para organismos aquáticos antes e após correção do pH**. 2013. 170 f. Tese Doutorado (Química na Agricultura e no Ambiente) Centro de Energia Nuclear na Agricultura– **Universidade de São Paulo**. Piracicaba, 2013.
- CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **ABRASCO**, Rio de Janeiro, 1ª Parte. p. 98, abril de 2012.
- CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L., MYERS M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ biological Indicator of Chemical Contaminant Effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 47, p. 2123 – 2136, novembro de 1990.
- CASA NOVA, F. M. **Caracterização *in silico* de biossensores em *Colossoma macropomum*: diagnóstico molecular e monitoramento de ambientes impactados**. 2008. 121 f. Dissertação - Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Instituto de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2008.
- CENTRO de informações sobre o Paraquat. **Dados e fatos sobre o Paraquat**. Disponível em: <<http://http://paraquat.com/en/facts/paraquat-technical-data>> Acesso em: 14/11/2017.
- CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D.M.; Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinic Exotic Animals**, p. 445–462, 2008
- CONNELL, D. W. **Basic concepts of environmental chemistry**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 506. 1997.
- ELAHEE, K. B.; BHAGWANT, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius. **Ecotoxicology Environmental Safety**. N. 68, p. 361- 371, Agosto de 2007.
- EVANS, D. H. **The Physiology of Fishes**. Boca Raton: CRC Press, p. 491. 1993.

EVANS, G. O. **Animal hematotoxicology**: a practical guide for toxicologists and biomedical. USA: CRC Press, p. 222. 2008.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, p. 81-95. Novembro de 2000.

FERNANDES; M. N.; MORON, S. E..Respiração e Adaptações Respiratórias. In: BALDISSEROTTO; B.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. (Org.). **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. Jaboticabal: FUNEP, UNESP, 2014, p. 336.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A. T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal Biology**, v. 71, n. 1, p. 179-188, fevereiro de 2011.

FILIZADEH, Y. An Ecological Investigation into the Excessive Growth of *Azolla* in the Anzali Lagoon and its Control. **Iranian Journal of Nature Resources**. P. 65-82, 2002.

GAO, R., CHOI, N., CHANG, S.I., KANG, S.H., SONG, J.M., CHO, S.I., LIM, D.W. and CHOO, J. Highly sensitive trace analysis of paraquat using a surface-enhanced Raman scattering microdroplet sensor. **Analytica Chimica Acta** 681, p. 87-91. Setembro de 2010.

GOMES, L.C.; SIMÕES, L.N.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B. e GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM.p.175-204, 2010.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos**: mutações, câncer e reprodução. Brasília: UnB, P. 392. 2005.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2ª ed. Lewis Publishers, Boca Raton, p. 384. 1995.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v.18, p.277 – 291, agosto de 1991.

HENARES M. N. P.; CRUZ C.; GOMES G. R.; PITELLI R. A.; MACHADO M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Acta Science Biology Science**. Maringá, v. 30, n. 1, p. 77-82, 2008.

HINTON, D. E., BAUMANN, P. C., GARDNER, G. R., HAWKINS, W. E., HENDRICKS, J. D., MURCHELANO, R. A., OKIRINO, M. S., Histopathology biomarkers. In: HUGGET, R. J., KIMERLE, R. A., MEHRLE Jr., P. M., ERGAMAN, H. L. **Biomarkers, Biochemical, physiological and histological markers of antoponenic stress**. Flórida: Lewis Piblishers, p. 155-209, 1992.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Séries Estatísticas e Séries Históricas: Defensivos agrícolas em linha de comercialização por classes toxicológicas 1992-2003**. Disponível em: <<http://serieestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=IU19&t=usoagrotoxicos-2-agrotoxicos-linha-comercializacao>>. Acesso em: 12 de nov 2017.

ISMAIL, B.S., SAMENI, M. AND HALIMAH, M. Evaluation of Herbicide Pollution in the Kerian Ricefields of Perak, Malaysia.World. **Application Science Journal** 15, p. 5-13. 2011.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. New York: Chapman & Hall, p. 455. 1995.

JURADO, A., FERNANDES, M., VIDEIRA, R., PEIXOTO. F., VICENTE, J. Herbicides: the Face and the Reverse of the Coin. An in Vitro Approach to the Toxicity of Herbicides in Non-Target Organisms. In: KORTEKAMP, A. (Ed.) **Herbicides and Environment**.p.3 - 44. 2011. ISBN: 978-953-307-476-4, In Tech, Acesso em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and/environment/herbicides-the-face-and-the-reverse-of-the-coin-an-in-vitro-approach-to-the-toxicity-of-herbicides-i>> Acesso em 21/02/2017.

KATHTEEN, A.; MAGUIRE-ZEISS.α-Synuclein: a therapeutic target for Parkinson's disease? **Pharmacological Research**, London, v. 58, n. 5/6, p. 271- 280, 2008.

LOBO, F. P.; CINTRA, L. C.; VARELA, E. S.; ALVES, A. L.; VILLELA, L. C. V.; SILVA, N. M. A. da; PAIVA, S. R.; CAETANO, A. R. Novo genome assembly of the South American freshwater fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: **PLANT & ANIMAL GENOME CONFERENCE**. San Diego, CA. [Abstracts...]. San Diego: [s.n.], 2015. PAG 2015. Pôster P0231. 2015.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: Articulação Nacional de Agroecologia (ANA) / Rede Brasileira de Justiça Ambiental (RBJA), p. 190. 2011.

LOPES, R. B. Análise ecotoxicológica dos xenobióticos triclorfon e diflubenzuron empregados na aquicultura continental. 2005. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) **Universidade de São Paulo**, Piracicaba, 2005.

MA J., et al. Immunological effects of paraquat on common carp, *Cyprinus carpio* L. Fish e Shellfish Immunology. **College of Life Science**, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China. p. 166-172, 2014.

MAHARAJAN, A.; RAJALAKSHMI, S.; VIJAYAKUMARAN, M.; KUMARASAMY. P. Sublethal effect of copper toxicity against histopathological changes in the spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). **Biol Trace Elem Res** v. 145, p. 201–210, 2012.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal Aquatic Science.**, v. 42, p. 630-648, 1985.

MENEZES, J. T. B.; QUEIROZ, L. J.; DORIA, C. R. C.; MENEZES JR, J. B. "Avaliação espermática pós descongelamento em tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)." **Acta Amazônica**, 38.2, 365-368, 2008.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) 2017. **Consulta pública:**Anvisa autoriza uso do paraquat por mais três anos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/anvisa-autoriza-uso-do-paraquat-por-mais-tres-anos>. Acessado em: 10/01/2018.

Ministério do Meio Ambiente (MME). **Agrotóxicos.** <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>> Acesso em 07-11-2017.

MORAES, F. D. Respostas Bioquímicas, genotóxicas, fisiológicas e histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix; agassiz 1829) exposto à cipermetrina (Galgotrin). **Tese** 147 f. **Universidade Federal de São Carlos**, SP, Centro de Ciências Biológicas e da Saude. Doutorado. 2013.

MARTINS, T. Paraquat: concepts, mode of action and related diseases **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 175-186, jul./dez. 2013

MÜLLER, W.; NÜSSE, M. MILLER, B. M.; SLAVOTINEK, A. VIAGGI, S. STREFFER, C. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. **Mutation Research** n. 366, p. 163-169, 1996.

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

PARMA de CROUX. M. J.; LOTESE, A.; CAZENAVE, J. Inhibition of plasma cholinesterase and acute toxicity of monocrotophos in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimaidae). **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, New York, v. 69, p. 356 – 363, 2002.

PERON, A. P.; NEVES, G. Y. S.; VALÉRICO, N. C.; VICENTINI, V. E. P. Ação tóxica do herbicida paraquat sobre o homem. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 7, n. 3. 2003.

RIBEIRO, L. R. SALVADORIL, M. D. F., MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. **Canoas: Ed. ULBRA**. p. 356. 2003.

RUSSO, C., LUCIA, R. MORESCALCHI, M. A., STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology And Environmental Safely**, nº 57, p. 168-174, 2004.

SAINT-PAUL, U. Ecological and physiological investigations on *Colossoma macropomum*, a new species for fish culture in Amazonia. **Mem. Asoc. Latinoam. Acuicult.** p. 501-518. 1984.

SALAZAR-LUGO, R.; ESTRELLA, A.; OLIVEROS, A; ROJAS-VILLARROEL, E.; VILLALOBOS, L. B.; LEMUS, M. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. P. 321–326, 2009.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. **Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro***. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). Mutagênese Ambiental. **Canoas: Ulbra**, p. 201-220. 2003.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A.S. Peixes comerciais de Manaus. **Manaus: IBAMA/PROVÁRZEA**, 144p. 2006.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**. P. 9 – 15. 1975.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W. & TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. **Dordrecht. Journal Aquatic Ecosystem Stress Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SHUGART, L. R.; MCCARTHY, J. F. HALBROOK, R. S. Biological markers of environmental and ecological contamination risk. **Anal N12**, p. 353-360, 1992.

SILVA, R. B.; ROCHA, C. A. M.; SALIBA, I. L. S.; PENA, S. A.; PINHEIRO, R. H. S.; Tocantins, T. A. 2010. Avaliação citogenética de eritrócitos de tambaquis (*Colossoma macropomum*) sob exposição ao Metilmercúrio. **62ª Reunião Anual da SBPC**. Disponível em <http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/5017.htm>. Acesso em: 21/01/2018.

SPACIE, A. and HAMELINK, J.L., 1985. **Bioaccumulation**. In: G.M. Rand and S.R. Petrocelli (Editors), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere **Publishing Corporation**., Washington, DC, pp. 495-525.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology normal and pathological features. 2.ed. **Kodansha: Gustav Fischer Verlag**, 1995.

TERRADAS, M. MARTIN, M.; TUSSEL, L. GENESCA, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research**, v. 705 p. 60–67, 2010.

TORRE, F. R.; SALIBÍAN, A.; FERRARRI, L. Assessment of the pollution impact in biomarkers of effect of a freshwater fish. **Chemos**. N. 68, p. 1582-1590, 2007.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**. V. 79, p. 201–204, 2006.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A. **Genotoxicidade ambiental**. In: Zaggato, P; Bertoletti, E. (Org.). *Ecotoxicologia aquática*. 1ed. São Carlos: RiMa, 2006, v. 1, p. 327-344.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for the health: risk assessment guidance for superfund (RAGS)**. 2002. Disponível em: www.epa.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7. Acesso em: 04/10/2017.

VENTURINI, F. P. Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) exposto a concentração subletal de triclorfon e recuperação. 2010, 90f. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Evolução) **Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR**. São Carlos – SP – Brasil, 2010.

VICARI, T. Avaliação do efeito mutagênico de duas concentrações (0,075µg/g E 0,75 µg/g) do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (PISCES) através dos ensaios cometa e micronúcleo. **Dissertação** (Mestrado) 2009. **Universidade Federal do Paraná**. Curitiba, 2009.

WENDELAAR BONGA, S. E. The modulating effect of individual differences on the impact of multiple stressors on homeostasis. **Comparative Biochemical Physiology** Part A, v. 151, n. 1, sup. 1. 2008. P. S

YE, C., WANG, X. and ZHENG, H. 2002. Biodegradation of Acetanilide Herbicides Acetachlor and Butachlor in soil. **Journal Environmental Science**, v. 14, p. 524-529.

CAPITULO 2

EFEITOS TÓXICOS E GENOTÓXICO DO HERBICIDA PARAQUAT NO TAMBAQUI

RESUMO

O Paraquat é um herbicida pertencente ao grupo químico dos bupiridílios e tem sua classificação toxicológica I – extremamente tóxico e classificação do potencial de periculosidade ambiental II – muito perigoso ao meio ambiente. Amplamente utilizado em agricultura, não é volátil, explosivo ou inflamável. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da exposição do tambaqui ao herbicida paraquat por 96 horas (CL_{50-96H} , concentração subletal), o potencial genotóxico, parâmetros hematológicos e bioquímicos. Em concentrações sub-letais (controle, 10 mg.L^{-1} , 15 mg.L^{-1}), verificou-se a recuperação em 7 e 15 dias sem exposição dos animais ao paraquat. Após as exposições ao herbicida, foi coletado sangue dos animais (punção da veia caudal) para análises de glicose, parâmetros hematológicos, micronúcleo e anomalias nucleares. Posteriormente os animais foram eutanasiados para retirada de fragmentos musculares e do fígado para quantificação do glicogênio. A CL_{50-96H} determinada para o tambaqui neste trabalho foi $26,66 \text{ mg.L}^{-1}$. O herbicida causou genotoxicidade (frequência de micronúcleos e anomalias nucleares) nos animais expostos por 96 horas e nas recuperações. Constatou alterações nos parâmetros hematológicos e no glicogênio dos tambaquis expostos e, mesmo após o período sem exposição ao paraquat, verificou-se que os animais não reverteram os danos causados pelo herbicida.

Palavras-chave: CL_{50} , glicogênio, glicose, hematologia, micronúcleo.

TOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE PARQUET HERBICIDE IN TAMBAQUI

ABSTRACT

Paraquat is a herbicide belonging to the chemical group of bipyridylium and has its toxicological classification I - extremely toxic and classification of environmental hazard potential II - very dangerous to the environment. Widely used in agriculture, it is not volatile, explosive or flammable. The objective of this work was to evaluate the effect of tambaqui exposure to the herbicide paraquat for 96 hours (CL_{50-96H} , sublethal concentration), genotoxic potential, hematological and biochemical parameters. At sub-lethal concentrations recovery was observed at 7 and 15 days without exposure of the animals to paraquat. After exposures to the herbicide, blood from the animals (caudal vein puncture) was collected for glucose analyzes, haematological parameters, micronuclei and nuclear anomalies. Later, the animals were euthanized to remove muscle and liver fragments for quantification of glycogen. The LC_{50-96H} determined for tambaqui in this work was 26, 66 $mg.L^{-1}$. The herbicide caused genotoxicity (frequency of micronuclei and nuclear abnormalities) in exposed animals for 96 hours and in recoveries. It found alterations in the haematological and glycogen parameters of the exposed tambaquis and, even after the period without exposure to paraquat, it was verified that the animals did not revert the damage caused by the herbicide.

Key-words: CL_{50} , glycogen, glucose, hematology, micronucleus.

1. INTRODUÇÃO

Em consequência do crescimento da população humana e do desenvolvimento industrial, a produção, o consumo e até mesmo a eliminação de resíduos aumentaram, originando maior poluição para os ecossistemas, sendo o ambiente aquático o mais atingido por poluentes, pois recebe direta e indiretamente agentes químicos provenientes da ação antrópica, comprometendo a qualidade deste ambiente (JHA, 2008).

Herbicidas constituem uma categoria heterogênea de produtos químicos especificamente fabricados para o controle de plantas invasoras, podendo alcançar o ecossistema aquático por meio do escoamento superficial do solo ou de forma intencional, aplicados diretamente na água (BOLOGNESI, 2003; TOMITA & BEYRUTH, 2002).

O paraquat é um herbicida pós-emergente das plantas infestantes, com ação não-sistêmica, utilizado para o controle de diversas ervas daninhas: *Ageratum conyzoides*, *Bidens pilosa*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crusgalli*, entre outras (segundo a ficha de informação de segurança do produto). Tendo em vista a possibilidade de contaminação do ambiente aquático por agentes tóxicos, tem-se a necessidade de estudos que testem a toxicidade de xenobióticos em espécies nativas, como por exemplo, o herbicida paraquat que possui alto potencial tóxico, e há poucos estudos toxicológicos do herbicida em espécies da fauna brasileira.

O tambaqui foi escolhido como organismo teste para este trabalho por ser uma espécie de peixe nativa da bacia amazônica e amplamente utilizada na piscicultura, tendo assim, importância ambiental e econômica.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito da exposição do tambaqui ao herbicida paraquat por 96 horas (determinando a CL_{50-96H}). Em exposição sub-letais por 96 horas, avaliaram-se o potencial genotóxico do herbicida para a espécie, utilizando o teste de micronúcleo e anomalias nucleares, os parâmetros hematológicos, a glicose sanguínea, o glicogênio hepático e muscular. Verificou-se também a “recuperação” (após 7 e 15 dias sem exposição ao herbicida) dos animais anteriormente expostos por um período de 96 horas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins, *campus* de Araguaína - TO. O herbicida utilizado foi Paraquat (1,1 dimetil-4,4 bipyridílo), pertencente ao grupo químico: bipyridílo, cuja classificação toxicológica é I: extremamente tóxico e a classificação do potencial de periculosidade ambiental é II: produto muito perigoso ao meio ambiente.

Juvenis de tambaqui (wt: 20,09 ± 3,25 g; Lt: 10,9 ± 1,25 cm) provenientes de uma piscicultura da região norte do Estado do Tocantins foram aclimatados por 30 dias em caixas de 1000 litros e alimentados com ração comercial. Posteriormente foram amostrados em aquários de 70 litros (3 réplicas, n = 15) dotados de aeração artificial contínua, dois dias antes do início dos experimentos. Um dia antes do experimento e durante o período experimental os animais permaneceram em jejum. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Tocantins/TO (protocolo número: 23.0.005897/2016-09).

2.1 Teste de Toxicidade Aguda

Para a determinação da CL_{50-96h} utilizaram-se as concentrações: controle, 10 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹, 30 mg.L⁻¹ e 35 mg.L⁻¹ (3 repetições, n = 15). Os animais foram distribuídos em aquários de 70 litros, dotados com sistema de aeração artificial constante, cada aquário contendo 5 animais, o sistema de condução dos testes foi o semi-estático: a cada 24 horas ocorria a troca de 85% da água e adicionados novamente as respectivas concentrações do herbicida em cada aquário.

As variáveis físico-químicas da água foram avaliadas diariamente, utilizando termômetro para aferir a temperatura e fitas Labcontest para o Ph, O₂, amônia e dureza. A mortalidade foi quantificada regularmente e os animais mortos retirados dos aquários. O valor da CL_{50-96h} foi estimado pelo método Trimmed Spearman-kaber (HAMILTON et al. 1977).

2.2 Exposição sub-letal do tabaqui ao Paraquat e posterior recuperação de 7 e 15 dias.

Para a realização do experimento de exposição sub-letal e recuperação foram utilizados juvenis de tabaqui distribuídos em aquários de 70 litros dotados de aeração artificial contínua. As concentrações do herbicida testadas: controle, 10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹ (3 repetições, n = 15) em sistema semi-estático. Após o período de exposição por 96 horas ao herbicida, os animais foram transferidos para aquários com água limpa e mantidos para as posteriores recuperações por 7 e 15 dias, sem exposição ao Paraquat.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo três aquários como controle da exposição 96 horas, seis aquários exposição 96 horas (três aquários de 10 mg.L⁻¹ e três de 15 mg.L⁻¹); três aquários como controle da recuperação 7 dias, seis aquários para recuperação 7 dias após exposição por 96 horas (três aquários de 10 mg.L⁻¹ e três de 15 mg.L⁻¹); três aquários como controle da recuperação 15 dias e seis aquários para recuperação 15 dias após exposição por 96 horas (três aquários de 10 mg.L⁻¹ e três de 15 mg.L⁻¹).

2.3 Micronúcleo e anomalias nucleares

Coletou-se sangue pela punção da veia caudal com seringas contendo anticoagulante EDTA após exposição dos tabaquis por 96 horas e as recuperações de 7 e 15 dias ao herbicida Paraquat. Foram selecionados aleatoriamente 10 animais dos grupos: controle, 10 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹ e 25 mg.L⁻¹; controle recuperação (7 e 15 dias), 10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹ (7 e 15 dias) e confeccionadas 2 lâminas de extensões sanguíneas por animal para análise dos micronúcleos conforme descrito por Grisolia e Cordeiro (2000).

As lâminas foram secas a temperatura ambiente durante 24 horas e posteriormente fixadas em metanol por 15 minutos, coradas com Giemsa 5% por 7 minutos, e contados 2000 eritrócitos para cada animal e subsequente quantificação de micronúcleos e anomalias nucleares, que foram expressas em porcentagem. Para a classificação e verificação do teste de micronúcleo, conforme descrito Fenech (2000), o micronúcleo deverá ser até um terço menor que o núcleo principal, não tocar o núcleo, também ter a mesma intensidade de coloração e refringência do núcleo principal.

As anomalias nucleares seguiram a classificação conforme descrito por Carrasco et al. (1990). Foram quantificadas células binucleadas (dois núcleos de tamanho iguais), células com núcleos "*Bleebed*" (evaginação do envelope nuclear, o qual contém euromatina), "*Lobed*" (evaginações nucleares maiores que a do "*Bleebed*") e "*Notched*" (corte notável no conteúdo do envelope nuclear).

2.4 Hematologia

Alíquotas de sangue foram separadas para determinação do hematócrito, hemoglobina, RBC, determinação dos índices hematimétricos, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e contagem diferencial de leucócitos conforme Ranzani-Paiva e colaboradores (2013).

2.5 Glicogênio

Para quantificação do glicogênio muscular e hepático, após insensibilização por secção medular, 10 animais de cada tratamento foram submetidos à eutanásia e coletaram-se fragmentos musculares (200 mg) e hepático (100 mg) que foram coletadas e congeladas. Após o descongelamento dos materiais, prosseguiram-se os procedimentos para análise de glicogênio. Alíquotas de tecido (músculo branco e fígado) foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados KOH6N. Os tubos foram encubados a 100 °C por 5 minutos até dissolução. Dessa mistura, 250 µL foram transferidos para outro tubo contendo 3 mL de etanol 70%, agitados em homogeneizador vórtex por 5 minutos e adicionados 100 µL de Sulfato de Pótassio (K₂SO₄). O precipitado foi centrifugado e o sobrenadante, descartado por inversão do tubo. O precipitado foi re-suspendido e adicionado 2 mL de água destilada. Em seguida foi adicionado 500µL de fenol 4,1% e 2 mL de ácido Sulfúrico (H₂SO₄). As amostras foram pipetadas em uma placa e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro Asys UVM 340 e absorvância em 480 nm. A concentração de glicogênio é expressa em µmols de glicosil-glicose g de tecido⁻¹(adaptado de DUBOIS et al., 1956; BIDINOTO et al., 1997).

2.6 Glicose

Para a análise de glicose utilizou-se glicosímetro portátil One Duth. Coletou-se sangue 10 animais por tratamento conforme descrito anteriormente e aplicado uma gota à fita do glicosímetro, após aproximadamente 3 segundos obtiveram-se o resultado em mg de glicose por dL de sangue.

2.7 Análises estatísticas

Para análise estatística utilizou-se o programa computacional “Instat para Windows”, aplicando Análise de Variância ANOVA. A diferença significativa entre os valores dos animais expostos ao herbicida em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As mortalidades dos animais no decorrer das 96 horas foram quantificadas para determinação CL_{50-96h} utilizando o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros de qualidade da água

Ao longo do período experimental as variáveis físico-químicas foram avaliadas e estiveram dentro dos valores aceitáveis para o cultivo de peixes, conforme Moreira et al. (2001) e estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 Valores das variáveis físico-químicas da água (média \pm SD) no teste de toxicidade aguda em tambaqui exposto ao herbicida paraquat.

Concentrações de herbicida	pH	O ₂ (ppm)	Dureza (ppm CaCO ₃)	Amônia (ppm)	Temperatura (°C)
Controle	7,20 \pm 0,50	6,50 \pm 0,90	50	0,005 \pm 0,0005	26,50 \pm 0,50
10 mg.L ⁻¹	6,80 \pm 0,50	6,50 \pm 0,90	50	0,005 \pm 0,0005	26,50 \pm 0,50
15 mg.L ⁻¹	6,70 \pm 0,40	6,20 \pm 0,70	50	0,005 \pm 0,0005	26,10 \pm 0,20
20 mg.L ⁻¹	7,10 \pm 0,10	6,20 \pm 0,80	50	0,005 \pm 0,0005	26,20 \pm 0,20
25 mg.L ⁻¹	6,80 \pm 0,50	6,20 \pm 0,80	50	0,005 \pm 0,0005	26,80 \pm 0,20
35mg.L ⁻¹	6,50 \pm 0,50	6,20 \pm 0,80	50	0,005 \pm 0,0005	27 \pm 0,20
35mg.L ⁻¹	6 \pm 0,50	6 \pm 0,80	50	0,005 \pm 0,0005	26,80 \pm 0,20

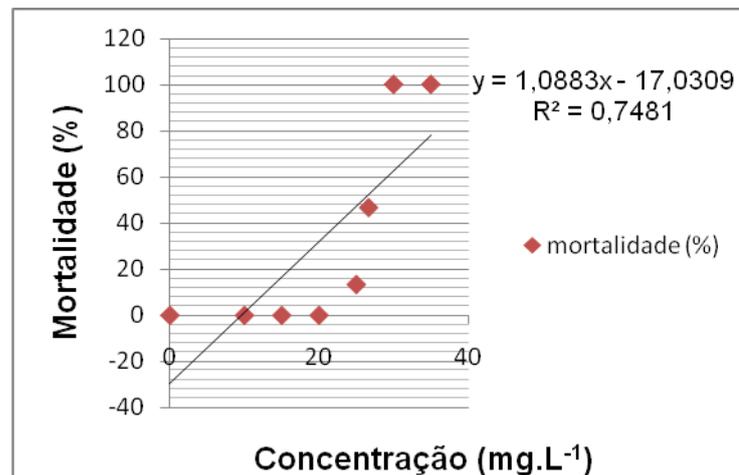
Legenda: * indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.2 Concentração letal média

A CL_{50-96H} do herbicida Paraquat para o tabaqui foi $26,66 \text{ mg.L}^{-1}$. Durante o período experimental, morreram 2 animais na concentração de 25 mg.L^{-1} e todos os animais da concentração de 30 mg.L^{-1} e de 35 mg.L^{-1} de Paraquat.

Na figura 1 estão representadas as porcentagens de mortalidade do tabaqui, obtidas através das exposições realizadas ao Paraquat para obtenção da CL_{50-96h} . A taxa de mortalidade aumentou com a elevação da concentração do herbicida e o valor do coeficiente de regressão linear foi $R^2 = 0,7481$ (figura 1).

Figura 1 Representação da relação mortalidade–concentração de paraquat para o tabaqui durante a determinação da CL_{50-96H} . Fonte: autor.



A concentração letal média (CL_{50}) é um instrumento importante para a avaliação toxicológica, uma vez que fornece a concentração estimada que cause 50% de mortalidade em animais por um determinado período de exposição, normalmente, de 24 a 96 horas (TOMITA; BEYRUTH, 2002).

Babatunde et al. (2001) utilizando o mesmo herbicida, verificaram que a CL_{50-96H} na tilápia (*Oreochromis niloticus*) foi de $11,84 \text{ mg.L}^{-1}$, valor menor do que o valor encontrado neste trabalho. A Ficha de Informações de Segurança do Produto (FISP) e a Ficha de Informações de Produtos Químicos do Paraquat (FIPQP), informa que a CL_{50-96H} para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) é de 55 mg.L^{-1} e para peixe zebra (*Danio rerio*) corresponde a $105,56 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente, resultados bem acima da CL_{50-96H} ($26,66 \text{ mg.L}^{-1}$) determinada no presente estudo.

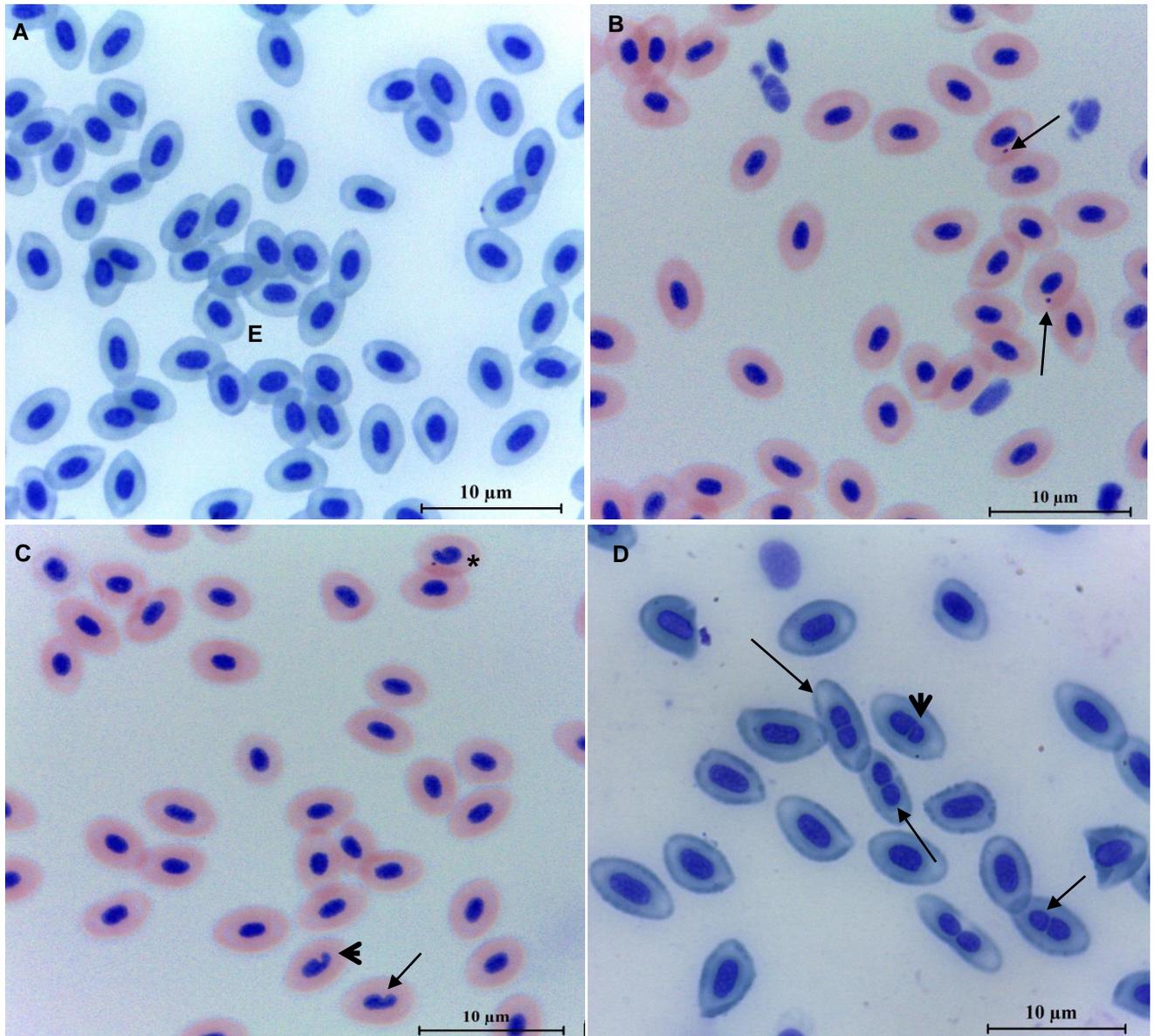
Henares e colaboradores (2010) utilizando o herbicida Diquat, mesmo grupo químico bupiridílio, em três espécies de peixes, observaram que a CL_{50-96h} em piauçu (*Leporinus macrocephalus*) foi de 26,22 $mg.L^{-1}$, para a tilápia (*Oreochromis niloticus*) a CL_{50-96h} foi 37,28 $mg.L^{-1}$ e para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a CL_{50-96h} do diquat foi de 82,72 $mg.L^{-1}$, evidenciando que as concentrações letais medias variam bastante conforme a espécie estudada.

A toxicidade de um determinado xenobiótico depende da suscetibilidade dos organismos a este agente tóxico. Diferentes espécies possuem sensibilidades diferentes de acordo com o seu aparato metabólico, hábitos alimentares e comportamentais, fase de desenvolvimento, pois indivíduos jovens geralmente são mais suscetíveis aos agentes químicos do que adultos, possivelmente em função as diferenças no grau de desenvolvimento e mecanismos de detoxificação que diversas espécies possam ter (SILVA E SANTOS, 2007).

3.3 Micronúcleo e anomalias nucleares

Foram encontrados micronúcleos (MN) e anomalias nucleares nos eritrócitos dos tambaquis expostos nas concentrações de 10 $mg.L^{-1}$, 15 $mg.L^{-1}$, 20 $mg.L^{-1}$ e 25 $mg.L^{-1}$ por 96 horas. Durante o período de recuperação por 7 e 15 dias, os animais também apresentaram MN e anomalias. A figura 2 exemplifica eritrócitos normais no grupo controle, MN e anomalias nucleares verificadas nos experimentos de exposição por 96 horas, recuperação por 7 dias e recuperação por 15 dias.

Figura 2 - Fotomicrografia dos eritrócitos do tambaqui, ilustrando eritrócitos normais, os micronúcleos e anomalias nucleares. Em (A) Eritrócitos normais (E), Grupo controle; (B) eritrócito com micronúcleo (setas), exposição por 96 horas; (C) eritrócitos com MN (asterisco), eritrócitos com núcleo *Notched* (seta), eritrócitos com núcleo *Blebbed* (cabeça de seta) exposição por 96 e recuperação 7 dias; (D) eritrócitos *binucleados* (setas), eritrócitos com núcleo *Lobed* (cabeça de seta), exposição por 96 e recuperação 15 dias. Coloração: Giemsa 5%. Barra em μm . Fonte: autor.



Os valores do micronúcleo e anomalias nucleares do tabaqui após exposição do herbicida Paraquat por 96 horas estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 Micronúcleo e anomalias nucleares (média \pm SD) em eritrócitos de tabaqui após 96 horas de exposição ao herbicida paraquat (controle, 10 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹ e 25 mg.L⁻¹).

	Controle	10 mg.L ⁻¹	15 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹
Micronúcleo (%)	1,50 \pm 0,50	8,20 \pm 1,50*	8 \pm 1,06*	9,95 \pm 1,80 *	8,45 \pm 0,90*
Binucleada (%)	0,08 \pm 0,08	1,12 \pm 0,33	1,41 \pm 0,50	2,45 \pm 0,90	2,04 \pm 1,20
Blebbled (%)	0	0,66 \pm 0,19	0,62 \pm 0,10	0,41 \pm 0,10	0,58 \pm 0,20
Lobed (%)	0	0,12 \pm 0,06*	0,79 \pm 0,20*	0,87 \pm 0,20*	0,79 \pm 0,20*
Notched (%)	0,04 \pm 0,04	1,16 \pm 0,40	1,25 \pm 0,20	1,58 \pm 0,50	1,25 \pm 0,40

Legenda: O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey (p < 0,05).

Os valores do micronúcleo e anomalias nucleares do tabaqui após exposição do herbicida Paraquat por 96 horas e recuperação por 7 dias estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 Micronúcleo e anomalias nucleares (média \pm SD) em eritrócitos de tabaqui após 96 horas de exposição do tabaqui ao herbicida paraquat e recuperação 7.

	Controle rec. 7 dias	10 mg.L ⁻¹ rec.7 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias
Micronúcleo(%)	0,25 \pm 0,10	2,20 \pm 0,80*	2,85 \pm 0,80*
Binucleada(%)	0,15 \pm 0,10	1,05 \pm 0,30	1 \pm 0,30
Blebbled(%)	0,10 \pm 0,10	0,50 \pm 0,20	0,55 \pm 0,10
Lobed(%)	0	1,40 \pm 0,40*	1,60 \pm 0,30*
Notched(%)	0,05 \pm 0,05	0,35 \pm 0,25	0,40 \pm 0,10

Legenda: O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey (p < 0,05).

Os valores do micronúcleo e anomalias nucleares do tabaqui após exposição do herbicida Paraquat por 96 horas e recuperação por 15 dias estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 Micronúcleo e anomalias nucleares (média \pm SD) em eritrócitos de tabaqui após 96 horas de exposição do tabaqui ao herbicida paraquat e recuperação 15.

	Controle rec.15 dias	10 mg.L ⁻¹ rec.15 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias
Micronúcleo(%)	0,40 \pm 0,10	1,10 \pm 0,30	1,50 \pm 0,30*
Binucleada(%)	0,30 \pm 0,10	0,65 \pm 0,10	0,60 \pm 0,10
Blebbled(%)	0,30 \pm 0,10	0,90 \pm 0,10	0,70 \pm 0,20
Lobed(%)	0,15 \pm 0,10	0,40 \pm 0,10	1,25 \pm 1*
Notched(%)	0,40 \pm 0,20	0,75 \pm 0,20	1,10 \pm 0,25

Legenda: O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey (p < 0,05).

Na exposição por 96 horas ocorreram diferenças significativa na frequência de micronúcleo e a anomalia *Lobed* em todos os tratamentos quando comparados com o grupo controle. Nos períodos sem exposição ao herbicida por 7 dias verificou-

se diferença significativa na frequência de micronúcleo e a anomalia *Lobed* em todos os tratamentos e em 15 dias sem exposição observa-se diferença somente na concentração de 15 mg.L⁻¹, quando comparada com o grupo controle.

Ateeq et al. (2002), relatam aumento significativo da frequência de micronúcleos e de células anormais em eritrócitos do peixe-gato (*Clarias batrachus*) após a exposição a outros herbicidas: 2,4-D (grupo químico: Ácido ariloxialcanóico) e butacloro (grupo: Ácidos Ariloxifenoxipropiônicos). Ventura (2004) relata que a análise do bioensaio, utilizando *Oreochromis niloticus*, mostrou que as frequências de células micronucleadas e portadoras de anormalidades nucleares, observadas para diferentes concentrações do herbicida atrazina (grupo: Triazina), foram significativamente mais altas que as observadas para o grupo controle.

O herbicida paraquat foi genotóxico ao tabaqui nas concentrações 10mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹ e 25 mg.L⁻¹ em período de 96 horas, e após o período de recuperação sem o contato como xenobiótico, os animais não conseguiram reverter este quadro completamente, visto que, somente os animais expostos a menor concentração (10mg.L⁻¹) do herbicida apresentou redução das frequências de micronúcleos.

Russo et al. (2004), relatam a redução na frequência de micronúcleo em peixes que foram retirados de áreas contaminadas e levados para condições laboratoriais sem a presença de contaminantes, quando comparados os resultados entre amostras coletadas no momento da captura, demonstrando a presença de mecanismos moleculares de reparo efetivo que determinam uma diminuição no dano do DNA após remoção dos animais do ambiente contaminado.

3.4 Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos

Os valores referentes à análise dos parâmetros hematológicos e os índices hematimétricos estão expressos na tabela 5. Houve diferença significativa da hemoglobina dos animais expostos a 20 e 25 mg.L⁻¹ por 96 horas, quando comparados ao grupo controle.

Tabela 5 Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos do tambaqui exposto por 96 horas de ao herbicida Paraquat (média ± SD).

	Controle	10 mg.L ⁻¹	15 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹
Hct (%)	21,13 ± 0,63	20,80 ± 0,61	23,60 ± 0,72	22 ± 0,51	21,20 ± 0,64
Hb (g/dL)	23,51 ± 0,94	22,10 ± 0,73	20,56 ± 0,51	19,75 ± 0,84*	19,06 ± 0,80*
RBC(mm ³)	2,10 ± 0,18	2,15 ± 0,20	2,01 ± 0,20	1,82 ± 0,15	1,79 ± 0,15
VCM (fL)	112,69 ± 11,70	110,62 ± 12,60	132,70 ± 13	131,54 ± 10,50	127,72 ± 8,80
HCM (pg)	127,77 ± 14,80	118,06 ± 13,60	117,60 ± 12,80	117,90 ± 10,30	116,80 ± 10,20
CHCM(g/dL)	1,12 ± 0,06	1,04 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,98 ± 0,04	0,99 ± 0,03

Legenda: O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey (p < 0,05).

No período de recuperação por 7 dias ocorreu diminuição do CHCM dos animais expostos a 10 mg.L⁻¹ e nos valores da hemoglobina, VCM, HCM e CHCM na concentração de 15 mg.L⁻¹ quando comparados ao controle(tabela 6).

Tabela 6 Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos do tambaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias ao herbicida Paraquat (média ± SD).

	Controle rec. 7 dias	10 mg.L ⁻¹ rec.7 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias
Hct (%)	18,06 ± 0,47	16,06 ± 0,50	16,93 ± 0,70
Hb (g/dL)	20,87 ± 10	22,4 ± 1	6,81 ± 0,66*
RBC (mm ³)	0,82 ± 0,10	0,90 ± 0,10	1,45 ± 0,10*
VCM (fL)	305,01 ± 43	241,80 ± 39	153,6 ± 25*
HCM (pg)	365,20 ± 59	326,50 ± 53	70,15 ± 43*
CHCM(g/dL)	1,16 ± 0,06	1,41 ± 0,08*	0,40 ± 0,04*

Legenda: O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey (p < 0,05).

Na tabela 7 observa-se que ocorreu diferença significativa na hemoglobina, HCM e CHCM dos animais expostos à 15 mg.L⁻¹ com 15 dias sem exposição ao paraquat.

Tabela 7 Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos do tambaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias ao herbicida Paraquat (média ± SD).

	Controle rec. 15 dias	10 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias
Hct (%)	20,66 ± 0,5	21,46 ± 0,90	18,46 ± 1
Hb (g/dL)	20,69 ± 1,4	22,05 ± 10	7,04 ± 0,56*
RBC (mm ³)	1,60 ± 0,09	1,65 ± 0,10	1,42 ± 0,10
VCM (fL)	136,87 ± 10,50	137,91 ± 10,81	143,64 ± 13,7
HCM (pg)	140,72 ± 15,10	136,26 ± 125,30	54,69 ± 7,10*
CHCM(g/dL)	1,02 ± 0,08	1,05 ± 0,06	0,39 ± 0,02*

Legenda: O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey (p < 0,05).

Na contagem diferencial de leucócitos, observou-se diferença somente das células LG-PAS em todos os tratamentos da exposição por 96 horas quando comparados ao grupo controle. Os valores referentes à contagem de leucócitos estão relacionados na tabela 8.

Tabela 8 Leucócitos do tambaqui após exposição por 96 horas ao herbicida Paraquat (média ± SD).

(μL)	Controle	10 mg.L ⁻¹	15 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹
LTs	42174 ± 7568,70	21371 ± 6303,60	36551 ± 7060,70	22468 ± 3920,70	37394 ± 10551
Tb	9603,80 ± 3266,60	7053,40 ± 2172,90	11018 ± 2100,70	11866 ± 3673	23926 ± 6091,60
Lf	37903 ± 7072,9	19821 ± 5849	35025 ± 6640,60	21980 ± 3865,80	35902 ± 10016
Nt	1054,70 ± 477,35	311,50 ± 112,64	297,20 ± 152,26	35,90 ± 18,71	356,30 ± 198,94
Mt	647,90 ± 235,19	1013,80 ± 570,48	665,50 ± 372,85	325,20 ± 90,57	710,8 ± 353,09
Bs	427,20 ± 176,14	40,80 ± 21,20	13,90 ± 13,90	5 ± 5	197,20 ± 197,20
LG-PAS	4,20 ± 1,30	1,10 ± 0,35*	1,40 ± 0,45*	0,50 ± 0,31**	0,50 ± 0,22**

Legenda: Leucócitos totais (LTs), trombócitos (Tb), linfócitos (Lf), neutrófilos (Nt), monócitos (Mt), basófilos (Bs), Leucócitos granulares – PAS positivo (LG-PAS). O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores referentes à série branca dos animais expostos ao Paraquat não diferiram estatisticamente em relação ao controle nas recuperações por 7 dias, tabela 9.

Tabela 9 Leucócitos do tambaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias após exposição ao herbicida Paraquat (média ± SD).

(μL)	Controle rec. 7 dias	10 mg.L ⁻¹ rec.7 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias
LTs	60045 ± 17192	88971 ± 16095	67479 ± 16596
Tb	10894 ± 3141,40	24013 ± 7664	8933,20 ± 2390,50
Lf	54899 ± 15524	84855 ± 15551	64365 ± 16033
Nt	1590,80 ± 683,68	936,90 ± 459,87	855,50 ± 513,05
Mt	1362,70 ± 775,58	1660,20 ± 703,60	760,20 ± 395,07
Bs	601 ± 387,55	86 ± 86	553,80 ± 196,48
LG-PAS	1992,60 ± 702,22	1433 ± 271,80	944,80 ± 296

Legenda: Leucócitos totais (LTs), trombócitos (Tb), linfócitos (Lf), neutrófilos (Nt), monócitos (Mt), basófilos (Bs), Leucócitos granulares – PAS positivo (LG-PAS). O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores referentes à série branca dos animais expostos ao Paraquat não diferiram estatisticamente em relação ao controle nas recuperações por 15 dias, estando estes apresentados na tabela 10.

Tabela 10 Leucócitos do tambaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias após exposição ao herbicida Paraquat (média ± SD).

(μL)	Controle rec. 15 dias	10 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias
LTs	60045 ± 17192	94213 ± 14929	67479 ± 16596
Tb	20713 ± 7299,70	25730 ± 8118,50	17029 ± 8010,30
Lf	54085 ± 15443	88815 ± 14776	62449 ± 15385
Nt	1499 ± 643,94	1489,10 ± 681,74	1623,80 ± 642,10
Mt	1017 ± 400,73	1759,20 ± 684,40	1506,20 ± 579,10
Bs	920,40 ± 403,88	308,90 ± 207,57	420,20 ± 182,20
LG-PAS	2523,80 ± 734,90	1927,50 ± 388,64	1480,50 ± 510,90

Legenda: Leucócitos totais (LTs), trombócitos (Tb), linfócitos (Lf), neutrófilos (Nt), monócitos (Mt), basófilos (Bs), Leucócitos granulares – PAS positivo (LG-PAS). O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste de Tukey ($p < 0,05$).

A hemoglobina dos animais expostos por 96 horas a 20 e 25 mg.L⁻¹ foi menor, quando comparados ao grupo controle. Safahieh et al. (2012) relatam redução no

hematócrito, hemoglobina e nos índices hematimétricos do peixe Benny (*Mesopotamichthys Sharpeyi*) após exposição ao Paraquat por 96 horas ($0,37\text{mg.L}^{-1}$, $0,74\text{ mg.L}^{-1}$ e $1,11\text{ mg.L}^{-1}$), e que estas alterações nos animais expostos reduzem o transporte de oxigênio, podendo interferir no crescimento, sobrevivência e até na reprodução dos animais.

Em relação a outros pesticidas, Köprücü e colaboradores (2006) observaram em seu estudo que o catfish (*Silurus glanis*) exposto a 1 mg.L^{-1} do inseticida OP diazinon (grupo dos organofosforados) por 96 horas apresenta, além de redução na hemoglobina total, redução do RBC, hematócrito, VCM, HCM e CHCM, estando atribuídas a ação interruptora do xenobiótico no tecido eritropoiético, causando redução na síntese de eritrócitos na medula óssea e anemia nos animais expostos.

Segundo Clauss et al. (2008), mudanças hematológicas associadas ao estresse podem permanecer durante dias, mesmo depois da remoção do agente estressor. Venturini (2010) relata diminuição do HCM em pacus após 7 dias de recuperação a exposição ao Triclorfon (grupo químico: organofosforado) e diminuição nos valores do hematócrito após 14 dias de recuperação, indicando anemia microcítica, relacionando esta alteração a exposição anterior ao xenobiótico.

Kori-Siakpere e colaboradores (2007) diferentemente dos resultados encontrados neste trabalho, verificaram aumento leucocitário em *Clarias gariepinus* (catfish) após exposição a doses sub-letais de Paraquat por 96 horas. Também verificaram redução nos parâmetros hematológicos, tais como hematócrito, hemoglobina, RBC, e nos índices hematimétricos VCM, HCM, CHCM, causando anemia e comprometendo a homeostasia dos peixes expostos. Esta resposta anêmica poderá ser um resultado da inibição da produção de eritrócitos pelo agente tóxico (SAMPRATH et al., 1993; SAHENY E JOHAL, 2000; PATNAIK E PATRA, 2006).

3.5 Glicogênio e Glicose

Na tabela 11 estão apresentados os valores do glicogênio hepático, glicogênio muscular e glicose sanguínea dos animais expostos ao paraquat por 96 horas.

Tabela 11 Glicogênio hepático, glicogênio muscular e glicose do tabaqui após exposição por 96 horas ao herbicida Paraquat (média \pm SD).

	Controle	10 mg.L ⁻¹	15 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹
Glicogênio Hepático₁	76,21 \pm 4,20	74,38 \pm 6,70	73,09 \pm 7,80	71,63 \pm 5,20	67,22 \pm 8,10
Glicogênio Muscular₁	18,92 \pm 2,30	17,09 \pm 1,50*	10,35 \pm 0,42*	10,30 \pm 0,30*	10,91 \pm 0,30*
Glicose₂	27,85 \pm 2,76	38,14 \pm 5,60	39,57 \pm 4,60	33 \pm 3,80	31,14 \pm 2,10

Legenda: 1- μ mol de glicosil-glicose g de tecido⁻¹, 2- mg de glicose dL⁻¹ sangue. O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste Tukey (p < 0,05).

Os valores do glicogênio hepático, do glicogênio muscular e da glicose dos tabaquis após 7 dias sem exposição ao herbicida paraquat estão expressos na tabela 12.

Tabela 12 Glicogênio hepático, glicogênio muscular e glicose do tabaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias após exposição por 96 horas ao herbicida Paraquat (média \pm SD).

	Controle Rec. 7 dias	10 mg.L ⁻¹ Rec. 7 dias	15 mg.L ⁻¹ Rec.7 dias
Glicogênio hepático₁	41,18 \pm 5,10	37,12 \pm 2,70	37,42 \pm 4,09
Glicogênio Muscular₁	15,69 \pm 0,70	15,74 \pm 0,80	15,01 \pm 0,80
Glicose₂	35,8 \pm 4,50	46,90 \pm 9,50	35,80 \pm 6

Legenda: 1- μ mol de glicosil-glicose g de tecido⁻¹, 2-mg de glicose dL⁻¹ sangue. O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste Tukey (p < 0,05).

Os valores referentes ao glicogênio hepático, muscular e a glicose dos tabaquis após 7 dias sem exposição ao herbicida paraquat estão expressos na tabela 13.

Tabela 13 Glicogênio hepático, glicogênio muscular e glicose do tabaqui após exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias após exposição por 96 horas ao herbicida Paraquat (média \pm SD).

	Controle Rec. 15 dias	10 mg.L ⁻¹ Rec. 15 dias	15 mg.L ⁻¹ Rec. 15 dias
Glicogênio hepático₁	47,12 \pm 2,30	21,92 \pm 1,50*	22,02 \pm 1,50*
Glicogênio Muscular₁	11,06 \pm 0,47	7,81 \pm 2,20	6,11 \pm 2,04*
Glicose₂	28,12 \pm 4,10	25,87 \pm 4,5	22,62 \pm 2,06

Legenda: 1- μ mol de glicosil-glicose g de tecido⁻¹, 2-mg de glicose dL⁻¹ sangue. O (*) indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle, teste Tukey (p < 0,05).

Ocorreu diferença significativa no glicogênio muscular dos animais expostos ao herbicida paraquat por 96 horas em todas as concentrações quando comparadas ao grupo controle. Após 7 dias sem exposição ao herbicida não se observa diferença significativa no glicogênio hepático, muscular e na glicose sanguínea. Porém após 15 dias sem exposição ao herbicida verifica-se que houve diferença estatística significativa nos valores do glicogênio hepático e muscular comparados com o controle, e isto pode estar relacionado ao período de exposição ao herbicida, haja

vista que, o grupo controle foi mantido nas mesmas condições dos tratamentos, exceto pelo fato de estarem em água sem contaminação.

Os carboidratos são usualmente a fonte primária de energia em casos de estresse, a exposição a pesticidas pode causar redução tanto nos níveis de glicogênio muscular quanto glicogênio hepático (HORI et al., 2006). No presente estudo observou-se redução nos níveis de glicogênio muscular dos tambaquis expostos por 96 horas ao xenobiótico, indicando um processo de glicogenólise, sendo utilizado como fonte energética no tecido muscular.

Venturi (2010) relatou em seu trabalho que o pacu reduziu os níveis de glicogênio hepático e muscular após exposição por 96 horas ao organofosforado trichlorfon, e mesmo após sete dias de recuperação ao herbicida, os animais permaneceram com os índices de glicogênio baixo, o autor relaciona este resultado ao processo de glicogenólise, pois a glicemia estava elevada e, após 14 dias de recuperação há um aumento no glicogênio, retornando aos níveis do controle, associando assim a um processo de recuperação. Diferentemente, no presente estudo a glicose não alteou significativamente, possivelmente por estar ocorrendo glicogenólise no fígado, fator este que pode ter mantido estes resultados para a glicose nos animais.

4. CONCLUSÃO

A $CL_{50-96 H}$ do herbicida paraquat para o tambaqui foi de 26,66 mg.L⁻¹.

O herbicida foi genotóxico aos animais e mesmo após as recuperações não foi possível reverter completamente este quadro, pois ainda havia alta frequência de micronúcleo e anomalia Lobed na concentração de 15 mg.L⁻¹ após a recuperação por 15 dias. O Paraquat causou redução na hemoglobina dos animais expostos e durante o processo de recuperação os parâmetros hematológicos demonstraram-se alterados. Observou redução nas células LG-PAS dos animais expostos por 96 horas. O glicogênio muscular após exposição por 96 horas e após 15 dias de recuperação e o glicogênio hepático diminuíram significativamente. Não houve recuperação dos animais expostos ao herbicida paraquat, pois mesmo após a retirada do herbicida do ambiente por 7 e 15 dias os animais permanecem com os valores do micronúcleo, anomalias nucleares, hematologia e glicogênio alterados, demonstrando assim que os animais não conseguiram reverter as alterações citadas anteriormente.

5. REFERÊNCIAS

ATEEQ, B.; ABDUL-FARAH, M.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 135-144, 2002.

BABATUNDE, M. M.; OLADIMEJI, A.A.; BALOGUN, J. K. Acute toxicity of gramoxone to *Oreochromis niloticus* (trewavas) in Nigeria. **Water, Air, and Soil Pollution** 131p.1–10, 2001.

BIDINOTTO, P. M.; SOUSA, R. H. S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical fresh water teleost fish: procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do CEPTA - Pirassununga**, v. 10 p. 56 - 60, 1997.

BOLOGNESI, C. **Genotoxicity of pesticides**: a review of human biomonitoring studies, **Mutation Research** 543, p. 251- 272, 2003.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, p. 2123 - 2136, 1990.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinic Exotic Animals**. n. 11, p. 445 - 462, 2008.

DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K.; ROBERTS P. A. SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chemical**. N. 28, p. 350 – 358, 1956.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81 95. 2000.

HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., THURSTON, V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technology**, V. 7, p. 714 - 719, 1977.

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; PITELLI, R. A.; MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda do herbicida diquat para três espécies de peixes. **XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**. Ribeirão Preto – SP. P. 3244 – 3248, 2010.

HORI, T. S. F.; AVILEZ, I. M.; INOUE, L. K. MORAES, G. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei):

characidae) juveniles. **Comparative Biochemical Physiology**, Part C, n. 143, p. 67 – 72, 2006.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207 – 221, 2008.

KÖPRÜCÜ, S. S.; KÖPRÜCÜ, K.; URAL, M. S.; ISPIR, Ü.; PALA, M. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). **Pest. Biochemical Physiology**, N. 86, p. 99 - 105, 2006.

KORI-SIAKPERE O.; ADAMU K. M.; MADUKELUM I. T. Acute Haematological Effects of Sublethal Levels of Paraquat on the African Catfish, *Clarias gariepinus* (Osteichthyes: Clariidae). **Research Journal of Environmental Sciences**, p. 331 - 335, 2007.

MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. et al. Fundamentos da moderna aquicultura. **Canoas: ULBRA**, 200 p. 2001.

PATNAIK, L. AND A.K. PATRA, Haematopoietic alterations induced by carbaryl in *Clarias batrachus* (Linn.). **J. Applied Science Environmental Manage**, p. 5-7, 2006.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; et al. Métodos para análise hematológica em peixes. **Editora da UEM**, Maringá, P. 137. 2013.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, P. 168 –174, 2004.

SAFAHIEH, A.; JADDI, Y.; YAVAR, V.; ZADEH, R. S. Sub-Lethal Effects of Herbicide Paraquat on Hematological Parameters of Benny Fish *Mesopotamichthys Sharpeyi*. **International Conference on Biotechnology and Environment Management**. V. 42, P. 141-145, 2012.

SAMPRATH, K.; VELAMNIAL, S.; KENNEDY I.J.; JAMES R., Haematological changes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* as a function of exposure period and sublethal levels of Ekalux. **Acta Hydrobiologica**, p. 73-83. 1993.

SILVIA, M.J. & SANTOS, J.R.; Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Oecologia brasiliensis**, v.11, n.4, p.565-573, 2007.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico 64**, São Paulo, v. 64, p. 135 - 142, 2002.

VENTURA C. B. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste. 2004. **Dissertação** (133 f.) **Universidade Estadual Paulista**, Rio claro – SP, 2004.

VENTURINI, F. P. Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) exposto à concentração subletal de triclofon e recuperação. 2010, 90f. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Evolução) **Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR**. São Carlos – SP – Brasil, 2010.

CAPITULO 3

HISTOPATOLOGIA DO FÍGADO, BRÂNQUIA E RIM DO TAMBAQUI APÓS EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA PARAQUAT

RESUMO

O herbicida paraquat é utilizado no controle de ervas daninhas que afetam diversas plantações. Objetivou-se avaliar histologicamente a integridade da estrutura branquial, fígado e rim no tambaqui após exposição por 96 horas ao herbicida paraquat (controle, 10 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹ e 25 mg.L⁻¹), 7 e 15 dias sem exposição ao herbicida nas concentrações (controle, 10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹). Após os experimentos, realizaram-se análises histopatológicas nas brânquias, fígado e rim dos animais. Observou-se que o herbicida causa diversos danos a histológicos nas brânquias (aneurisma, edema, hipertrofia celular, hiperplasia), fígado (hipertrofia celular, degeneração nuclear, estagnação biliar, entre outras) e rim (aumento do lumen tubular, degeneração tubular, obstrução do lúmen tubular) dos animais expostos por 96 horas, e mesmo após os períodos de recuperação os animais não conseguiram reverter às alterações nestes órgãos.

Palavras-chave: paraquat, histologia, tambaqui.

HISTOPATHOLOGY OF LIVER, GUN, AND RIB OF TAMBAQUI AFTER EXPOSURE TO THE HERBICIDE PARAQUAT

ABSTRACT

The herbicide paraquat is used to control weeds that affect various crops. The objective of this study was to evaluate histologically the integrity of the branch, liver and kidney structure in tambaqui after 96 hours exposure to the herbicide paraquat (control, 10 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹ and 25 mg.L⁻¹), 7 and 15 days without exposure to the herbicide at the concentrations (control, 10 mg.L⁻¹ and 15 mg.L⁻¹). After the experiments, histopathological analyzes were performed on the gills, liver and kidney of the animals. It was observed that the herbicide causes several histological damages in the gills (aneurysm, edema, cellular hypertrophy, hyperplasia), liver (cellular hypertrophy, nuclear degeneration, biliary stagnation, among others) and kidney (tubular lumen enlargement, tubular degeneration, of the tubular lumen) of the exposed animals for 96 hours, and even after the recovery periods the animals were unable to revert to changes in these organs.

Key-words: paraquat, histology, tambaqui

1. INTRODUÇÃO

O herbicida paraquat é um sal solúvel em água que desseca rapidamente todo o tecido verde no qual entra em contato, largamente utilizado em agricultura, não é volátil, explosivo ou inflamável em solução aquosa (PERON et al., 2003). O contato do peixe com o paraquat pode causar distúrbios no nível de atividade de diversas enzimas envolvidas em atividades bioquímicas, alteração dos fatores sanguíneos e lesão tecidual (BANAEI et al., 2013).

As brânquias, o fígado e o rim são órgãos vitais para os peixes, por estarem relacionados com respiração, osmorregulação, metabolismo bioquímico, excreção e manutenção da homeostase dos fluidos corporais, respectivamente. Portanto, alterações nestes órgãos comprometem o funcionamento normal do organismo e podem ser utilizadas para o monitoramento ambiental (MEYER; HENDRICKS, 1985; SCHWAIGER, 2001; GERNHOFER et al., 2001).

Para o presente estudo foram utilizados peixes juvenis de *Colossoma macropomum*, popularmente conhecidos como tambaqui. Essa espécie é o segundo maior peixe de escamas da América do Sul (GOULDING; CARVALHO, 1982). É uma espécie cuja resposta a diversos tipos de estressantes é conhecida, demonstrando ter sensibilidade a uma vasta gama de xenobiontes (ARANHA, 2013; CUNHA 2014).

Objetivou-se avaliar histologicamente a integridade do epitélio branquial, fígado e rim no tambaqui após 96 horas de exposição ao herbicida paraquat e recuperação de 7 e 15 dias sem exposição ao herbicida nas concentrações .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins, campus de Araguaína - TO. Juvenis de tambaqui provenientes de uma piscicultura da região norte do Estado do Tocantins foram aclimatados por 30 dias em caixas de 1000 litros e alimentados com ração comercial.

Posteriormente juvenis de tambaquis (wt: $20,09 \pm 3,25$ g; Lt: $10,9 \pm 1,25$ cm) foram amostrados em aquários de 70 litros (3 repetições, n = 15) dotados de aeração artificial constante. Um dia antes do experimento e durante todo o período experimental os animais permaneceram em jejum. Esta pesquisa foi aprovada pelo

Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Tocantins/TO (protocolo número: 23.0.005897/2016-09).

O herbicida utilizado foi o Paraquat (1,1 dimetil-4,4 bipyridílio), grupo químico – bipyridílio, nas concentrações por 96 horas foram: grupo controle, 10 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 25 mg.L⁻¹, 30 mg.L⁻¹ e 35 mg.L⁻¹. O sistema de condução dos testes foi o semi-estático.

Após a exposição por 96 horas, realizaram-se dois experimentos: exposição por 96 horas/recuperação por sete dias e exposição por 96 horas/recuperação por quinze dias. As concentrações em ambos foram: controle, 10 mg.L⁻¹ e 15 mg.L⁻¹. Todos os aquários continham aeração artificial.

2.1 Histopatologia das brânquias, fígado e rim

Após os experimentos de 96 horas de exposição, recuperação por 7 e 15 dias, os animais foram coletados e insensibilizados por secção medular e efetuou-se a eutanásia e retirada das brânquias, fígado e rim para análise histopatológica. Os tecidos foram fixados em bouin, posteriormente, as amostras foram desidratadas em banhos sucessivos de álcool (80%, 90%, 95%, e 100%) e clarificadas em xilol (FERNANDEZ et. al., 2011). Foram confeccionados cortes seriados de 5µm de espessura para confecção de laminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), para análise em microscopia de luz (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Todas as seções foram analisadas usando imagens obtidas em um microscópio LEICA ICC50HD conectado a um computador pelo o programa LAZ 2.0. Para análise das alterações histopatológicas foram utilizados 7 animais (escolhidos aleatoriamente) de cada tratamento. Nas brânquias, as alterações foram analisadas nos filamentos e lamelas usando 5 campos aleatórios e 10 lamelas por campo em aumento de 40x. No fígado e no rim, realizou a análise em 5 campos em aumento de 100x.

A análise histopatológica nas brânquias, fígado e rim foi avaliada por dois métodos semi-quantitativos: Valor Médio de Alterações (VMA) e pelo Índice de Alterações Histológicas (IAH). O cálculo do (VMA) é baseado na incidência de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração

histopatológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão).

Para avaliar a severidade das alterações nas brânquias, no fígado e no rim utilizou-se o Índice de Alterações Histológicas (IAH) segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundžic (1994), onde cada alteração foi classificada em graus progressivos quanto ao comprometimento das funções teciduais: estágio I, alterações que não comprometem o funcionamento do órgão; estágio II para alterações mais severas que comprometem o funcionamento do órgão, mas são reversíveis; e estágio III, para as alterações mais graves que comprometem de forma irreversível o funcionamento do órgão. Um valor de IAH foi calculado para cada animal, de acordo com a fórmula: $IAH = (1 \times \Sigma I) + (10 \times \Sigma II) + (100 \times \Sigma III)$, onde ΣI , ΣII e ΣIII correspondem ao número de alterações de estágio I, II e III respectivamente. Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do tecido; entre 11 e 20 indicam danos leves ao órgão; entre 21 e 50 indicam danos moderados; de 51 a 99, danos severos e maiores que 100 indicam danos irreversíveis no tecido.

2.2 Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. Para os resultados do VMA e IAH foram realizadas Análise de Variância: ANOVA (seguida pelo Teste de Dunnett), utilizando o software GraphPad InStat v 3.00 para Windows 95[®] e GraphPad Prisma v 5.00 (GRAPHPAD INSTAT, 1998). Para diferenças significativas, foi considerada a probabilidade de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Brânquias

Várias alterações foram observadas nas brânquias do tambaqui exposto ao Paraquat. Na tabela 1 estão apresentadas a frequência de ocorrência das alterações histopatológicas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função branquial encontradas nos animais expostos por 96 horas.

Tabela 1 Frequência das alterações histopatológicas nas brânquias de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat.

Alteração	Estágio	Controle	10 mg.L ⁻¹	15 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹
Hiperplasia	I	0	0+	+	0	+
Hipertrofia	I	0	0+	0+	0	0+
Fusão parcial	I	0	0	0+	0	0
Deslocamento epitelial	I	0	0	0	0+	0
Edema	I	0	0	0	0+	0
Aneurisma	II	0	0	0	0+	0+

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

Na tabela 2 estão apresentadas as frequências das alterações histopatológicas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função branquial do tambaqui exposto ao Paraquat por 96 horas e 7 dias sem exposição ao herbicida.

Tabela 2 Frequência das alterações histopatológicas nas brânquias de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 7 dias.

Alteração	Estágio	Controle rec. 7 dias	10 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias
Hiperplasia	I	0	0	+
Hipertrofia	I	0	+	+

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

A tabela 3 apresenta as alterações observadas nas brânquias do tambaqui exposto ao Paraquat por 96 horas e 15 dias sem exposição ao herbicida.

Tabela 3 Frequência das alterações histopatológicas nas brânquias de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 15 dias.

Alteração	Estágio	Controle rec. 15 dias	10 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias
Hiperplasia	I	0	0	+
Hipertrofia	I	0	+	+
Deslocamento epitelial	I	0	+	+
Edema	I	0	+	+

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

A brânquia é o sítio da respiração, osmorregulação, regula o equilíbrio ácido-base, realiza a excreção de resíduos nitrogenados, além do controle neural e hormonal (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005). Assim, uma vez que estão em contato direto com água, substâncias tóxicas, como por exemplo, pela presença de agrotóxicos podem facilmente interferir na morfofisiologia deste órgão (CAPKIN et. al., 2010; BENZE, 2013).

Após 96 horas de exposição do tambaqui ao paraquat observaram-se lesões de estágio I e II, leves a moderadas, mas que podem comprometer o funcionamento normal do órgão, dentre estas destacasse a hiperplasia que ocorreu com frequência nas brânquias dos animais. Em 7 dias sem exposição ao herbicida verificou-se lesões de estágio I (leves): hipertrofia ocorreu com frequência na concentração de 15 mg.L⁻¹ e hiperplasia em 10 mg.L⁻¹. As alterações branquiais após 15 dias sem exposição ao herbicida também foram de estágio I: hiperplasia, hipertrofia, deslocamento epitelial e edema, podem comprometer o funcionamento normal do órgão.

A hiperplasia, também encontrada nas brânquias dos peixes expostos ao paraquat, caracteriza-se pelo aumento na proliferação das células e a hipertrofia celular caracteriza-se pelo aumento no volume celular, ambas podem levar à fusão das lamelas e, mais raramente, dos filamentos (HEATH, 1987; HINTON et al., 1992).

Deslocamento epitelial caracteriza-se pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio lamelar para longe do sistema de células pilares, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue. Ocorre a formação de um espaço que pode ser preenchido por água, podendo levar a formação de um edema (WENDELAAR BONGA, 1997; THOPHON et al., 2003). Esta alteração é interpretada como uma reação inicial das brânquias ao estresse químico, causado por uma variedade de xenobióticos. O deslocamento epitelial diminui a vulnerabilidade da área superficial das brânquias, entretanto, pode prejudicar a eficiência das trocas gasosas e transporte iônico (MALLAT, 1985; WINKALER et al., 2001).

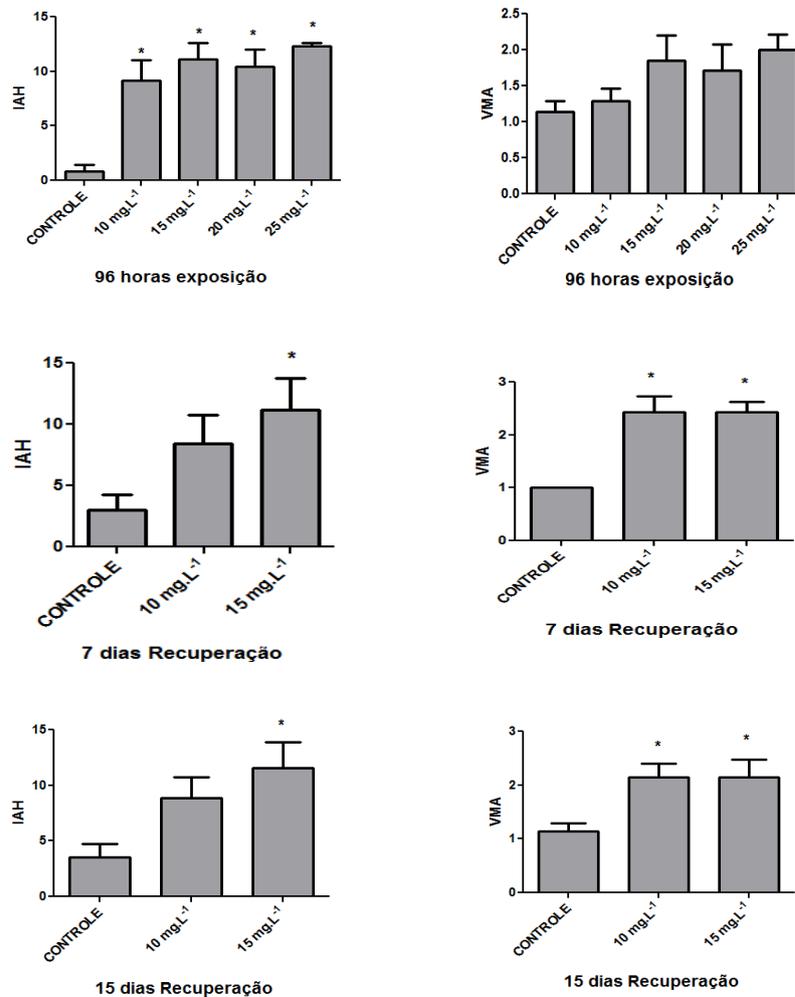
As lamelas branquiais dos tambaquis expostos também apresentaram alteração vascular: o aneurisma, que normalmente resulta do colapso do sistema de células pilares, prejudicando a integridade vascular com a liberação de grande quantidade de sangue que empurra o epitélio lamelar para fora (HEATH, 1987; HINTON; LAURÉN, 1990).

Banaee et al. (2013) utilizaram o herbicida Paraquat no peixe gourami (*Trichogaster trichopterus*) e observaram que após exposição os animais apresentaram hiperplasia, fusão lamelar e necrose, afirmam ainda que estas lesões se intensificam conforme aumentam as concentrações do herbicida. Henares et al (2008) observaram a frequência de lesões nas brânquias (deslocamento epitelial, hiperplasia e fusão lamelar) do pacu exposto por 96 horas ao herbicida utilizando o

herbicida Reward (grupo químico Bipiridílio). Estas alterações indicam a redução da eficiência da lamela branquial em realizar suas funções fisiológicas, pois estas lesões histopatológicas descritas podem causar danos à integridade funcional da brânquia (MALLATT, 1985).

O Índice de Alterações Histopatológicas (IAH) e o Valor Médio de Alterações (VMA) das brânquias do tambaqui expostos ao paraquat por 96 horas, 7 e 15 dias de recuperação estão apresentados na figura 1.

Figura 1- Valores médios do IAH e VMA nas brânquias do tambaqui exposto ao herbicida paraquat. Exposição por 96 horas, exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias e exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias. Dados são as médias \pm erro padrão. Considerou-se diferença significativa $p < 0,05$, teste Dunnet. (*) diferença significativa em relação ao controle. Fonte: autor.



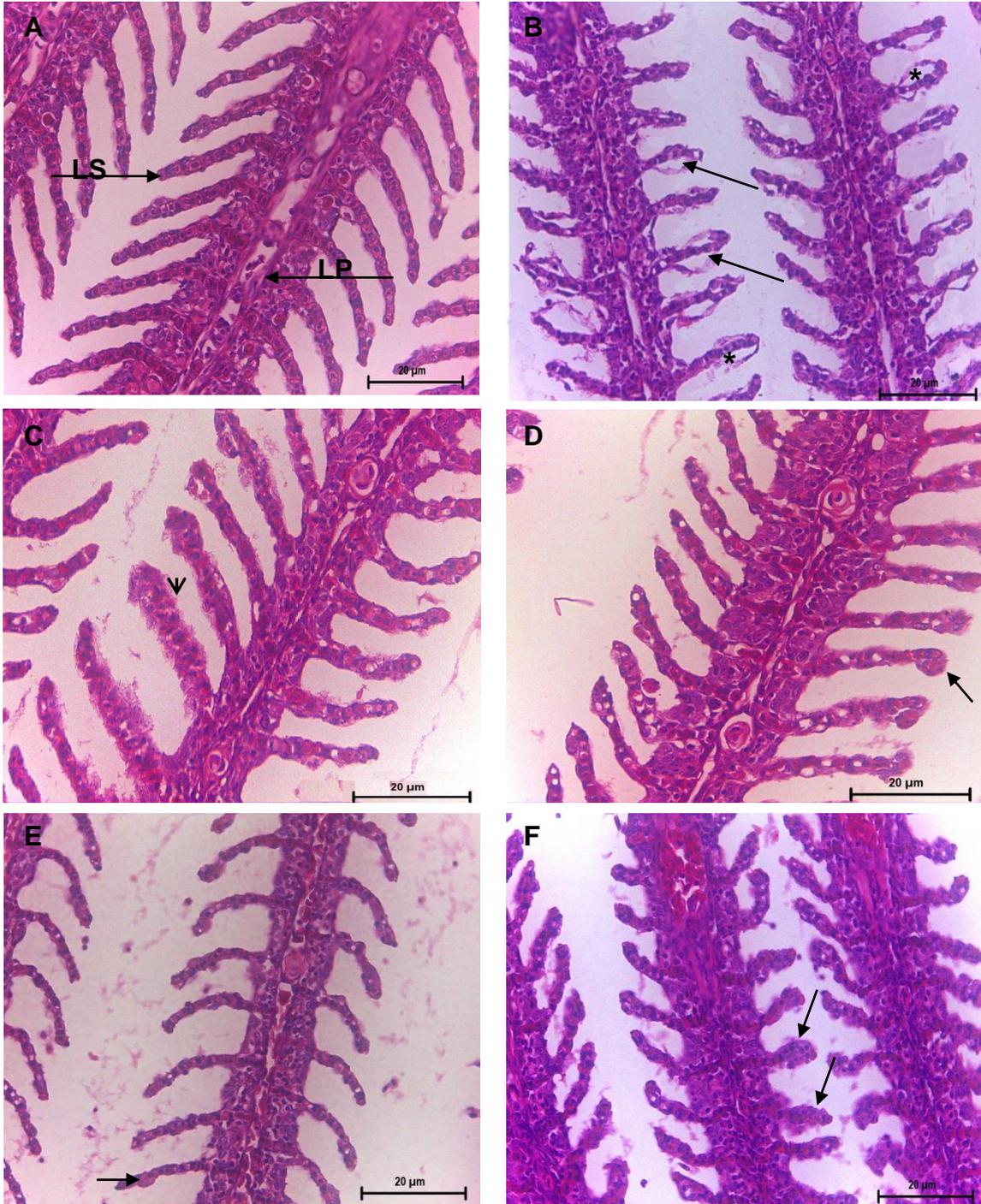
O IAH branquial do tambaqui após exposição por 96 horas ao paraquat apresentou diferença significativa em todas as concentrações, quando comparadas ao grupo controle. Durante o período de recuperação por 7 e 15 dias o IAH foi

significativamente diferente somente na concentração de 15 mg.L⁻¹. Não houve diferença significativa do VMA na exposição por 96 horas, porém nas recuperações de 7 e 15 dias houve diferença significativa quando comparados ao grupo controle.

Os índices de alterações histopatológicas revelam a distribuição de frequência das alterações e o estado de funcionamento ou comprometimento dos órgãos estudados (SCHWEIGER et al., 1997). O IAH foi significativo em todas as concentrações na exposição por 96 horas e na concentração de 15 mg.L⁻¹, tanto na recuperação por 7 dias quanto na recuperação por 15 dias. As lesões no tecido branquial encontradas no tambaqui exposto ao paraquat foram leves a moderadas, mas que podem comprometer o funcionamento normal do órgão.

No presente trabalho, algumas alterações encontradas nas brânquias do tambaqui podem ser consideradas adaptativas, pois diminuem a superfície de contato das lamelas com a água e conseqüentemente com o xenobiótico. Porém estas alterações observadas, como hiperplasia, deslocamento do epitélio e edema, podem reduzir a eficiência da lamela branquial em realizar suas funções fisiológicas e, de acordo com Fanta et al. (2003) estas alterações reduzem a absorção de oxigênio, devido ao aumento da distância da difusão gasosa nas brânquias. Na figura 2 estão representados o grupo controle e as principais alterações nas brânquias dos animais expostos ao herbicida Paraquat.

Figura 2- Fotomicrografia das alterações histopatológicas mais frequentes nas brânquias do tambaqui expostos ao herbicida Paraquat. (A) grupo controle, filamento branquial sem alterações – lamela secundária (seta LS) e lamela primária (seta LP); (B) exposição 96 horas e recuperação por 15 dias, descolamento epitelial das lamelas (setas) edema (asterisco); (C e D) exposição por 96 horas, aneurisma (seta) hiperplasia celular (cabeça de seta); (E) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, Hipertrofia (seta); (F) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, hiperplasia das células da lamela secundária (setas). Coloração HE. Barra em μm . Fonte: autor.



3.2 Fígado

A frequência de ocorrência das alterações histopatológicas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função hepática verificadas nos animais expostos por 96 horas ao paraquat estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 Frequência das alterações histopatológicas no fígado do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat.

Alteração	Estágio	Controle	10 mg.L ⁻¹	15 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹
Hipertrofia nuclear	I	0	0	0+	0+	+
Núcleo na periferia da célula	I	0	0	0+	+	+
Hipertrofia celular	I	0	0+	0+	0+	+
Vacuolização citoplasmática	I	+	+++	+++	+++	+++
Dilatação dos Sinusóides	I	0	0+	0+	0	0
Estagnação biliar	II	+	++	+++	+++	+++
Congestão vascular	II	0	0+	0+	+	0
Degeneração nuclear	II	0	0+	0+	0+	0+
Ausência de núcleo	II	0+	++	++	++	++

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

A frequência de ocorrência das alterações histopatológicas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função hepática encontradas nos animais na recuperação por 7 dias estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 Frequência das alterações histopatológicas no fígado de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 7 dias.

Alteração	Estágio	Controle rec. 7 dias	10 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias
Hipertrofia nuclear	I	0	+	+
Núcleo na periferia da célula	I	0	++	++
Vacuolização citoplasmática	I	0	0+	0+
Estagnação biliar	II	+	++	++
Degeneração nuclear	II	0	0	0+

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

A frequência de ocorrência das alterações histopatológicas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função hepática encontradas nos animais na recuperação por 15 dias estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 Frequência das alterações histopatológicas no fígado de do tabaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 15 dias.

Alteração	Estágio	Con. Rec. 7 dias	10 mg.L ⁻¹ Rec. 7 dias	15 mg.L ⁻¹ Rec. 7 dias
Núcleo na periferia da célula	I	0	+++	++
Vacuolização citoplasmática	I	0	0+	0+
Estagnação biliar	II	0	++	++

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

Durante a exposição por 96 horas ao paraquat os tabaquis apresentaram uma série de alterações histológicas de estágio I e II no fígado. As alterações hepáticas encontradas nos tabaquis foram: hipertrofia nuclear, hipertrofia celular, núcleo na periferia da célula, vacuolização citoplasmática, dilatação dos sinusóides, estagnação biliar, congestão vascular, degeneração nuclear e ausência de núcleo.

Os tabaquis expostos ao Paraquat por 96 horas e recuperação por 7 dias apresentaram alterações histológicas de estágio I e II no fígado. As mais frequentes foram: hipertrofia nuclear, núcleo na periferia da célula, estagnação biliar, respectivamente.

Após o período de recuperação por 15 dias os tabaquis apresentaram algumas alterações histológicas de Estágio I e II no fígado. As lesões observadas nos hepatócitos dos tabaquis após o período de 15 dias sem exposição ao Paraquat foram: núcleo na periferia da célula, e estagnação biliar.

Hipertrofias celulares e nucleares e ausência de núcleo indicam a grande atividade da célula em decorrência da presença de algum composto químico ou ausência de alguma substância (MEYER; HENDRICKS, 1985; HINTON et al., 1992; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995) podendo resultar em necrose (FANTA et al., 2003; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Alterações como degeneração nuclear pode indicar disfunções induzidas por algum agente tóxico, uma vez que áreas metabolicamente ativas do fígado ficam reduzidas, levando a uma possível redução geral nas funções desempenhadas por este órgão (HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON et al., 1992; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; TEH et al., 1997).

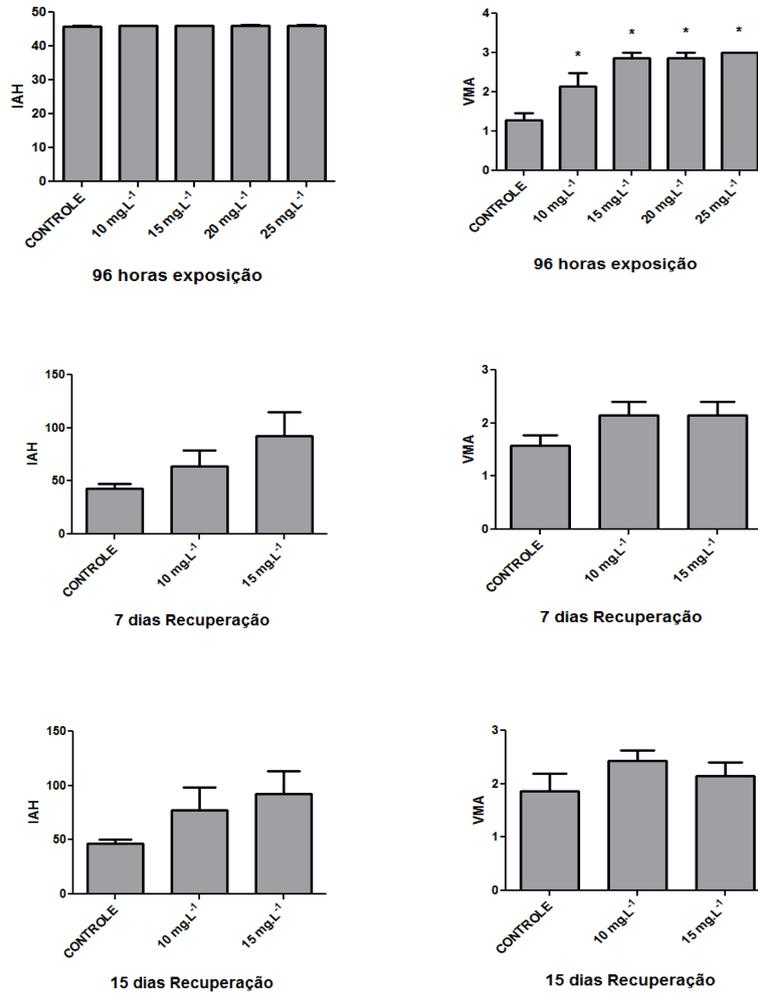
A estagnação biliar, ou colestase introhepatocítica, se caracteriza pelo acúmulo de bile nos hepatócitos em forma de grânulos amarelo-castanho no citoplasma, ocorre em função de uma mudança no metabolismo do órgão, podendo comprometer o metabolismo de lipídeos (PACHECO; SANTOS, 2002). Tal alteração foi observada com frequência nos tabaquis expostos ao Paraquat. Esse acúmulo

de bile indica possíveis danos ao metabolismo hepático em peixes de ambientes naturais poluídos (MELETTI; ROCHA; SILVA, 2004; CASTRO et al, 2014; SANTOS et al., 2014) e submetidos a testes com herbicidas (FANTA et al., 2003).

Ma e Li (2015) verificaram que a carpa (*Cyprinus carpio*) apresentou hipertrofia dos hepatócitos, vacuolização citoplasmática após exposição ao herbicida Paraquat. Henares e colaboradores (2008) observaram que a tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao herbicida Diquat (grupo químico biperidílio) apresentaram alterações histopatológicas no fígado: desarranjo da organização cordonal, hipertrofia dos hepatócitos, picnose nuclear, deslocamento do núcleo para a periferia das células. A mudança, na granulação citoplasmática dos hepatócitos, provoca redução da eficiência do fígado podendo causar o mau funcionamento de outros órgãos levando o peixe à morte.

O Índice de Alterações Histopatológicas (IAH) e o Valor Médio de Alterações (VMA) hepático do tambaqui expostos ao paraquat por 96 horas, 7 e 15 dias de recuperação estão apresentados na figura 3.

Figura 3 - Valores médios do IAH e VMA no fígado do tabaqui exposto ao herbicida paraquat. Exposição por 96 horas, exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias e exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias. Dados são as médias \pm erro padrão. Considerou-se diferença significativa $p < 0,05$. (*) diferença significativa em relação ao controle. Fonte: autor.



Após exposição do tabaqui por 96 horas e nas recuperações ao Paraquat o IAH não apresentou diferença significativa, quando comparadas ao grupo controle. Houve diferença significativa do VMA em todas as concentrações na exposição por 96 horas, e nas recuperações de 7 e 15 dias não houve diferença significativa quando comparadas ao grupo controle.

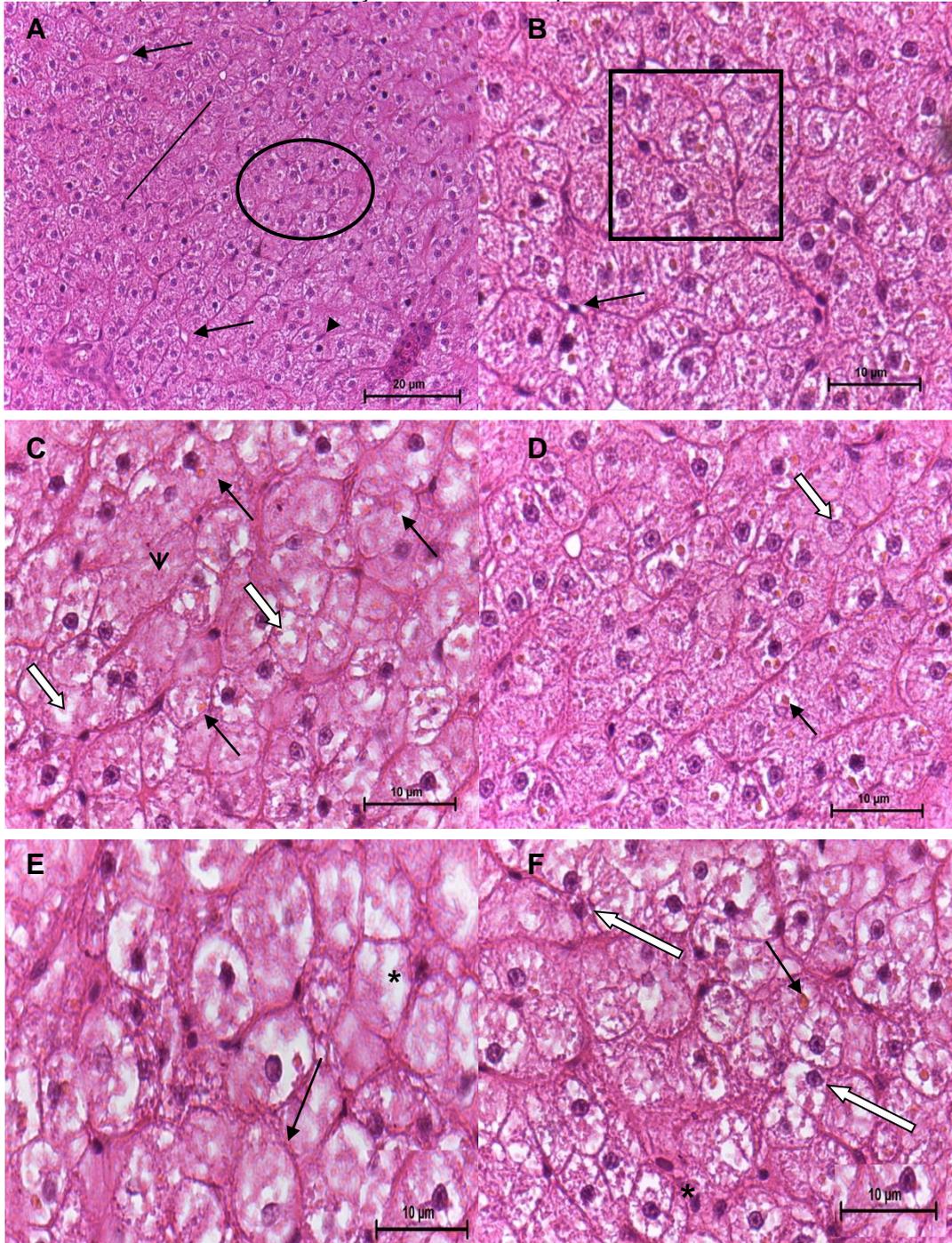
Os valores de VMA hepático obtidos para o tabaqui exposto ao herbicida indicou a ocorrência de lesões pontuais a amplamente distribuídas. Houve diferença estatística significativa do VMA em todas as concentrações na exposição por 96 horas, e nas recuperações de 7 e 15 dias não houve diferença estatística significativa quando comparadas ao grupo controle. Os valores do IAH dos animais

expostos ao herbicida por 96 horas e as recuperações diferiram estatisticamente do grupo controle.

A concentração de xenobióticos no fígado, a excreção desses agentes ou de seus metabólitos através da bile ou até mesmo a conversão dessas substâncias nos hepatócitos, podem ocasionar lesões neste órgão causando complicações graves para o metabolismo do organismo (HEATH, 1987; HINTON et al., 1992). Por isso, estas alterações histopatológicas são biomarcadores eficientes que indicam a exposição prévia do animal a estressores presentes no ambiente (HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON et al., 1992).

Na figura 4 está representada a imagem do fígado do grupo controle e as imagens das principais lesões verificadas no fígado dos animais expostos ao herbicida paraquat.

Figura 4 - Fotomicrografia das alterações histopatológicas mais frequentes no fígado d do tambaqui expostos ao herbicida Paraquat. (A) grupo controle, arranjo cordonal dos hepatócitos (traço), sinusóides (setas), hepatócitos (área circular), célula de Kupffer (cabeça de seta). (B) grupo controle, hepatócitos (área quadrangular), célula de Kupffer (seta); (C) exposição por 96 horas, vacuolização citoplasmática (seta branca), estagnação biliar (setas), ausência de núcleo (cabeça de seta); (D) exposição por 96 horas, degeneração nuclear (seta branca) estagnação biliar (seta); (E) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, hipertrofia celular (seta), vacuolização citoplasmática (asterisco); (F) exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias, estagnação biliar (seta), núcleo na periferia da célula (seta branca). Coloração HE. Barra em μm . Fonte: autor.



3.3 Rim

A frequência de ocorrência das alterações histopatológicas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função renal encontradas nos animais expostos por 96 horas ao paraquat estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 Frequência das alterações histopatológicas no rim de do tabaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat.

Alteração	Estágio	Controle	10 mg.L ⁻¹	15 mg.L ⁻¹	20mg.L ⁻¹	25mg.L ⁻¹
Núcleo picnótico	I	0	0+	0+	0	0
Hipertrofia das células tubulares	I	0	+	+	0	++
Obstrução tubular	I	0+	+	++	0+	+
Dilatação dos vasos sanguíneos	I	0	0	0	0	0+
Presença de novos néfrons	I	0	0	+	0	+
Degeneração tubular	II	0	0	0	+++	+

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

A frequência de ocorrência das alterações histopatológicas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função renal encontradas nos animais no período de recuperação por 7 dias estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 Frequência das alterações histopatológicas no rim de do tabaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 7 dias

Alteração	Estágio	Con. rec. 7 dias	10 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 7 dias
Hipertrofia das células tubulares	I	0	0+	++
Desorganização tubular	I	0	0+	++
Núcleo picnótico	I	0+	+	0+
Presença de novos néfrons	I	0	+	0
Obstrução tubular	I	+	++	+++
Dilatação dos capilares glomerulares	I	0	0	+
Aumento do lúmen tubular	I	0	0+	0
Degeneração nuclear das células tubulares	II	+	+	+
Degeneração tubular	II	0	0	0+

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

A frequência de ocorrência das alterações histopatológicas e a classificação quanto ao grau de severidade e comprometimento da função renal encontradas nos animais no período de recuperação por 15 dias estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 Frequência das alterações histopatológicas no rim de do tambaqui exposto por 96 horas ao herbicida Paraquat e recuperação por 15 dias

Alteração	Estágio	Con. rec. 15 dias	10 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias	15 mg.L ⁻¹ rec. 15 dias
Hipertrofia das células tubulares	I	0	0	+
Desorganização tubular	I	0	0	0+
Presença de novos néfrons	I	0	++	++
Obstrução tubular	I	+	+++	+++
Degeneração nuclear das células tubulares	II	+	0+	+++
Degeneração tubular	II	0	0	0+

Legenda: 0 = alterações ausentes; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.

Os tambaquis expostos ao Paraquat por 96 horas apresentaram uma série de alterações histológicas no rim. As mais frequentes foram lesões de Estágio I e II. As alterações no rim foram: hipertrofia das células tubulares, obstrução tubular, presença de novos néfrons, degeneração tubular.

Na recuperação por 7 dias os tambaquis apresentaram várias alterações histológicas de estágio I e II no rim. As alterações encontradas foram: hipertrofia das células tubulares, desorganização tubular, núcleo picnótico, presença de novos néfrons, obstrução tubular, dilatação dos capilares glomerulares, degeneração tubular.

Após a recuperação por 15 dias os tambaquis apresentaram diversas alterações histológicas no rim. As mais frequentes foram lesões de Estágio I e II, sendo elas respectivamente: hipertrofia das células tubulares, presença de novos néfrons, obstrução tubular, degeneração nuclear das células.

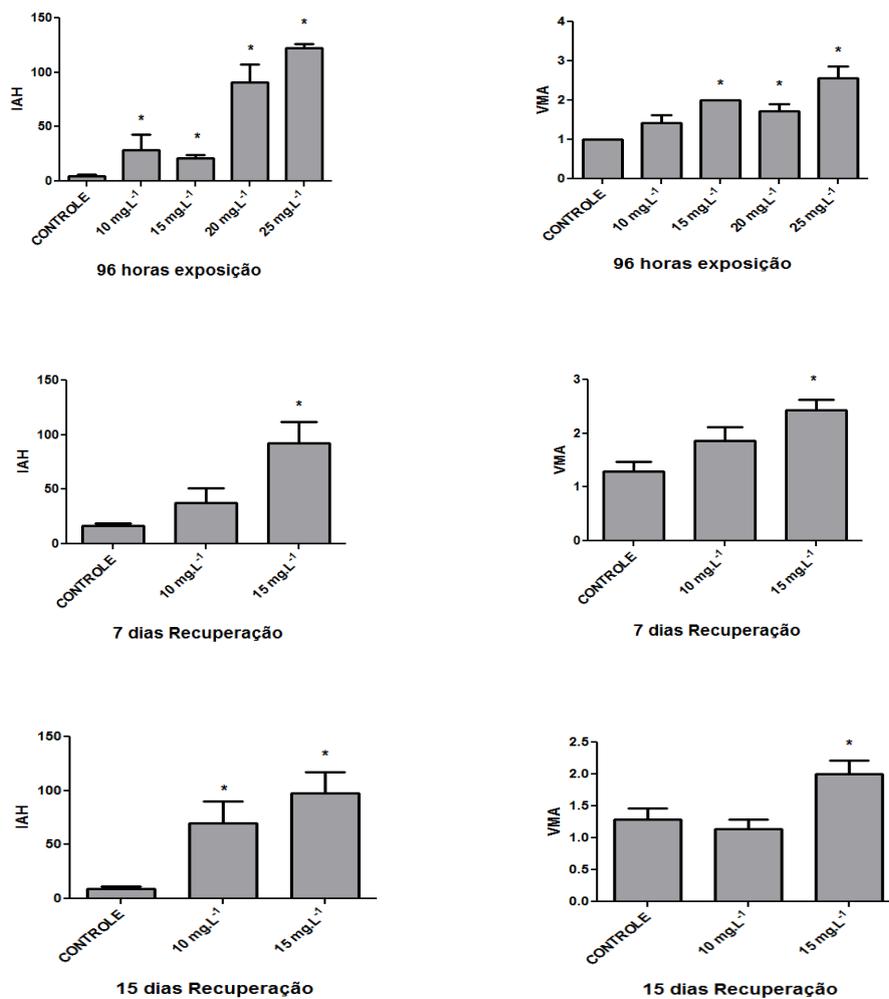
O rim do tambaqui apresentou diversas alterações histológicas de estágios I e II, que podem comprometer a atividade normal do tecido. Em virtude de o rim ser um órgão que recebe grande fluxo sanguíneo a presença de compostos químicos no sangue pode levar a algumas mudanças patológicas na cápsula de Bowman, como proliferação anormal das células epiteliais e o espessamento da lâmina basal, levando a redução do espaço de Bowman.

Túbulos renais pré-existentes podem ser frequentemente regenerados após serem danificados por algumas doenças (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Segundo Hinton e Laurén (1990) a regeneração tubular em peixes pode ser uma boa indicação de adaptação e recuperação. Após dano renal induzido por agentes tóxicos, pode haver a produção de néfrons inteiramente novos (REIMSCHUESSEL, 2001; TAKASHIA; HIBIYA, 1995).

O novo néfron demora várias semanas para amadurecer, desenvolvendo os segmentos proximal e distal e tornando-se cada vez mais eosinófilo quando se distinguem as células do estágio adulto (CORMIER et al., 1995). A presença de novos néfrons em peixes pode indicar que o comprometimento fisiológico destes não está impedindo qualquer regeneração tecidual (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

O Índice de Alterações Histopatológicas (IAH) e o Valor Médio de Alterações (VMA) renaldo tambaqui expostos ao paraquat por 96 horas, 7 e 15 dias de recuperação estão apresentados na figura 5.

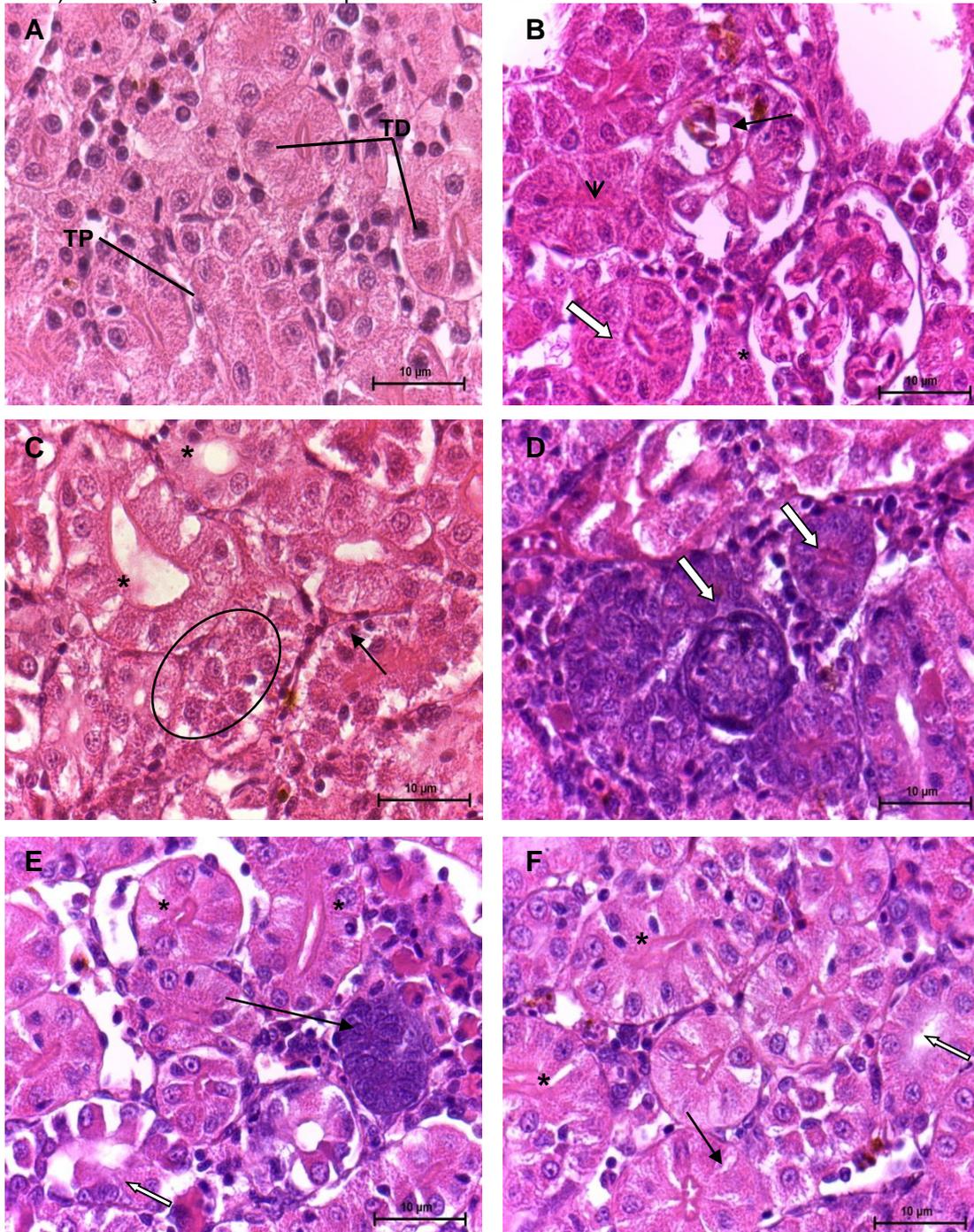
Figura 5- Valores médios do IAH e VMA rim do tambaqui exposto ao herbicida paraquat. Exposição por 96 horas, exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias e exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias. Dados são as médias \pm erro padrão. Considerou-se diferença significativa $p < 0,05$. (*) diferença significativa em relação ao controle. Fonte: autor.



Após exposição do tabaqui por 96 horas ao Paraquat o IAH apresentou diferença significativa em todas as concentrações quando comparadas ao grupo controle. Nas recuperações por 7 e 15 dias o IAH apresentou diferença estatística significativa na concentração de 15 mg.L⁻¹. Podemos observar o mesmo para o VMA, houve diferença significativa em todas as concentrações na exposição por 96 horas, e nas recuperações de 7 e 15 dias houve diferença significativa na concentração de 15 mg.L⁻¹, quando comparadas ao grupo controle (figura 5).

O IAH foi significativo em todas as concentrações na exposição por 96 horas e na recuperação por 15 dias. Na recuperação por 7 dias foi maior na concentração de 15 mg.L⁻¹ quando comparado com o grupo controle. As lesões no tecido renal encontradas no tabaqui exposto ao paraquat foram leves a moderadas, mas que podem comprometer o funcionamento normal do órgão devido a sua alta frequência. Na figura 6 está representada a imagem do rim dos tabaquis no grupo controle e das principais lesões verificadas nos animais expostos ao herbicida paraquat.

Figura 6 -Fotomicrografia das alterações histopatológicas mais frequentes no rim do tambaqui expostos ao herbicida Paraquat. (A) grupo controle, túbulo distal (TD) e túbulo proximal; (B) exposição por 96 horas, hipertrofia da célula tubular (seta), obstrução do lúmen tubular (cabeça de seta) e degeneração nuclear da célula tubular (seta branca); (C) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, aumento do lúmen tubular (asterisco), núcleo picnótico (seta) e desorganização tubular (área circular); (D) exposição por 96 horas e recuperação por 7 dias, novos néfrons (seta branca); (E) exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias, degeneração tubular (seta branca) e novos néfrons (seta); (F) exposição por 96 horas e recuperação por 15 dias, aumento do lúmen tubular (seta branca), degeneração nuclear da célula tubular (seta) e obstrução tubular (asterisco). Coloração HE. Barra em μm . Fonte: autor.



4. CONCLUSÃO

O herbicida Paraquat causou diversas alterações histopatológicas na brânquia, fígado e rim do tambaqui e, apesar destas alterações serem de leves a moderadas, comprometem a função destes órgãos, pois podemos verificar isto com o Índice de Alterações Histopatológico e o Valor Médio de Alterações, que são estatisticamente maiores quando comparados ao grupo controle e indicam comprometimento dos órgãos. Os danos histopatológicos no tambaqui permanecem mesmo depois da retirada do paraquat do ambiente, pois os animais não apresentam melhoras ao que se refere às alterações histopatológicas após o período sem exposição ao paraquat, demonstrando que o herbicida pode causar risco a saúde por um longo período.

5. REFERÊNCIAS

ARANHA, R. C. Potencial de toxicidade dos herbicidas Glifosao e Imazetapir em *Colossoma macropomum* (pisces). **Dissertação** (Mestrado) 67 f. 2013.

Universidade Federal do Oeste do Pará. Santarém. 2013.

BANAE, M., SUREDA, A., MIRVAGEFEI, A.R. AND AHMADI, K. Biochemical and histological changes in the liver tissue of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sub-lethal concentrations of diazinon. **Fish Physiology Biochemical** (in press). 2013.

BENZE, T. P. Efeitos da exposição ao inseticida difluzenzuron em curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae). São Carlos, 2013. 71f. **Dissertação** (Mestrado) – **Universidade Federal de São Carlos.** São Carlos, 2013.

CAPKIN, E.; TERZI, E.; BORAN, H.; YANDI, I.; ALTINOK, I. Effects of some pesticides on the vital organs of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Tissue and Cell.**, v. 42, p. 376–382, 2010.

CASTRO, J. S.; SILVA, J. S.; FREITAS, L. C.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n. 6, p. 1687 - 1694, 2014.

COMIER, S. M.; NEIHEISEL, T. W.; WERNING, P.; RACINE, R. N.; REIMSCHUESSEL, R. New nephron development in fish from polluted waters: a possible biomarker. **Ecotoxicology**, n. 4, p. 156 - 168, 1995.

CUNHA, F. S. Efeitos tóxicos de inseticidas piretróides sobre o peixe tambaqui (*colossoma macropomum*). **Dissertação** (MESTRADO) 54 f. 2014. **Universidade Tiradentes.** Aracaju – SE. 2014.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiology Ver.** v. 85, p. 97 - 177, 2005.

FANTA, E.; RIOS, F.S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.G.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 119 - 130, 2003.

FERNANDEZ, W. S.; DIAS, J. F.; RIBEIRO, C. A. O.; AZEVEDO, J. de S. Liver Damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella Brasiliensis*

(Actynopterigii, Atherinopsidade) from two beaches in southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 59, n. 2, p. 163 - 169, 2011.

GERNHOFER, M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MULLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. v. 8, p. 241 – 260, 2001.

GOULDING, M., CARVALHO, M.L., **Life history and management of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish**. Rev. Bras. Zool., São Paulo 1, 107, 1982.

HEATH, A. G. Water Pollution and Fish Physiology. 2. ed. C.R.C. **Press, Lewia Publishers**, 1987. p. 342.

HENARES M. N. P.; CRUZ C.; GOMES G. R.; PITELLI R. A.; MACHADO M. R. F.; Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Acta Sci. Biol. Sci.** Maringá, v. 30, n. 1, p. 77 - 82, 2008.

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

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

MA, J.; LI, X. Effect of paraquat on common carp. **Biochem Molecular Toxicology** V. 29, N. 1, 2015.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Can. Journal Aquatic Science**, v. 42, p. 630-648, 1985.

MELETTI, P. C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C. B. R. **Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E. L. G. (Org.). **Limnologia Fluvial - Um Estudo no Rio Mogi-Guaçu**. São Carlos, 2003, p. 149-180.

MEYERS, T. R.; HENDRICKS, J.D. **Histopathology**. IN: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Editores). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. **Hemisphere Publishing Corporation**, Washington: p. 283-331, 1985.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 33 – 347, 2002.

PERON, A. P.; NEVES, G. Y. S.; VALÉRICO, N. C.; VICENTINI, V. E. P. Ação tóxica do herbicida paraquat sobre o homem. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 7, n. 3. 2003.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIC, V. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution**. In MÜLLER, R.; LLOYD, R. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. **Oxford: Fishing News Books**, cap. 30, p. 339 - 352, 1994.

REISCHUESSEL, R. A fish modelo f renal regeneration and development. **Ilar Journal**, n. 42, p. 1159 - 1166, 2001.

SANTOS FILHO, F. M.; REZENDE, K. F. O.; EMERENCIANO, A. K.; MOREIRA, L. M.; VILA, V. B.; BORGES, R. M.; PRESSINOTTI, L. N. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. **ASA**, v. 2, n. 1, 2014.

SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 231 – 240, 2001.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology normal and pathological features. 2. ed. Kodansha: **Gustav Fischer Verlag**, 1995.

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

THOPHON, S.; KRUAETRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass,

Lates calcarifer, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**. v. 121, p. 307 – 320, 2003.

WENDELAAR BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. **Physiological Review**, E.U.A., v. 77, n. 3, p. 591- 620, 1997.

WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R.
Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.