

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA**

VANILVA PEREIRA DE OLIVEIRA

Avaliação toxicológica em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações do herbicida 2,4 diclorofenoxiacético

Toledo
2021

VANILVA PEREIRA DE OLIVEIRA

Avaliação toxicológica em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações do herbicida 2,4 diclorofenoxiacético

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Manejo e Conservação de Recursos Pesqueiros de Águas Interiores

Orientador: Prof. Dr. Gilmar Baumgartner
Co-orientadora: Prof^a Sabrina Grassioli

Toledo
2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Oliveira, Vanilva Pereira

Avaliação toxicológica em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações do herbicida 2,4 diclorofenoxiacético / Vanilva Pereira Oliveira; orientador Gilmar Baumgartner; coorientadora Sabrina Grassioli. -- Toledo, 2021.

57 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2021.

1. Jundiá. 2. histologia. 3. hematologia. 4. lipoperoxidação. I. Baumgartner, Gilmar, orient. II. Grassioli, Sabrina, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

VANILVA PEREIRA DE OLIVEIRA

Avaliação toxicológica em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações do herbicida 2,4 diclorofenoxiacético

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, e avaliada pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Prof. Dr. Gilmar Baumgartner
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Geuza Cantanhêde da Silva
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Luciano Caetanos de Oliveira
Universidade Federal do Paraná

Aprovada em: 31 de maio de 2021.
Local de defesa: Videoconferência síncrona.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por toda força e coragem que me proporcionou durante essa trajetória.

A meu pai PEDRO (in memoria) e minha mãe ZENAIDE, que sempre acreditaram, mesmo sem ter o entendimento, de onde eu poderia chegar!

Ao meu esposo EMERSON, por ter acreditado no meu crescimento e por ter suportado todo o meu estresse e angústia durante esse período de busca pelo conhecimento.

E ao meu filho LORENZO, que mesmo sem entender, estava lá me acompanhando nas horas mais difíceis.

Aos meus IRMÃOS por apoiarem esse meu sonho, mesmo sem compreender completamente o que eu estava fazendo, em especial a minha irmã VANILCE por todo apoio na retaguarda dessa minha trajetória.

Aos meus SOBRINHOS e SOBRINHAS, que sempre se orgulharam das minhas lutas.

A UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Toledo, por todo o conhecimento disponibilizado, por todo o apoio, e todos os recursos fornecidos para a realização deste trabalho.

A UNIOESTE, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel, por todo respaldo e contribuição de suas dependências para realização de análises, que foram significativas para a conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador Dr. GILMAR BAUMGARTNER, por acreditar no meu potencial e pela disponibilidade em me ajudar todas as vezes que se fizeram necessárias.

A minha Co-orientadora Dra. SABRINA GRASSIOLLI, que se colocou à disposição em todos os momentos que precisei.

Aos meus colegas que foram de suma importância nessa caminhada, em especial a GILDETE e o ALDO.

Por cada pessoa que de certa forma contribuiu direta ou indiretamente, com a realização desse trabalho, registro aqui minha gratidão.

Dedicatória: Ao meu Pai (in memoria), que um dia sonhou com uma filha Doutora, dedico este trabalho, que marca o final de um percurso recheado de experiências inesquecíveis.

RESUMO

Um dos herbicidas mais comumente usados na agricultura é o ácido 2,4 diclorofenoxiacético, seu uso indiscriminado tem gerado aumento da poluição das águas, causando grandes preocupações ambientais. O objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos toxicológicos do herbicida 2,4-D em juvenis de *Rhamdia quelen* (jundiá). Para tal, 96 exemplares de *Rhamdia quelen* foram submetidos a um teste agudo (96h) de exposição ao herbicida 2,4 D nas concentrações crescentes de 0,0; 15; 30 e 45 mg/L. Para cada concentração foram feitas 4 réplicas, com 6 exemplares cada. Após 96 horas, os animais foram pesados, medidos e anestesiados para a coleta de sangue para as análises hematológicas, sendo quantificados: o número de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e monócitos. Em seguida, os animais foram eutanasiados e laparatomizados para a coleta dos músculos e fígados destinados às análises histomorfométricas e bioquímicas. Para histomorfometria, fígado e músculo foram isolados limpos e pesados sendo submetidos a técnicas histológicas de rotina, corados e avaliados quanto ao Índice hepatossomático (IHS) e Fator de condição (FC). Um fragmento hepático, foi destinado análise enzimática da LPO, AChE e PT. As análises hematológicas mostraram que o 2,4-D provoca alteração no número de leucócitos, monócitos e trombócitos, em todas as concentrações em comparação ao grupo controle (não exposto). Já o valor médio de eritrócitos foi de $1,6 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$. O 2,4-D não alterou significativamente o diâmetro das fibras musculares ($p \leq 0,05$), porém o herbicida nas concentrações de 30 e 45mg/L reduziu e aumentou, respectivamente, o número de hepatócitos quando comparado ao grupo controle (não exposto). A atividade da LPO hepática não foi alterada pelo 2,4-D em nenhuma concentração utilizadas. Similarmente, não foi evidenciada inibição da atividade da Acetilcolinesterase (AChE) hepática nos animais expostos ao 2,4-D ($p \leq 0,05$). Todavia, nas concentrações de 30 e 45mg/L do 2,4-D foi observada redução da proteína total. As alterações encontradas em *Rhamdia quelen* expostos a 2,4-D indicam que, agudamente a exposição ao herbicida promove principalmente danos hepáticos e hematológicos, indicando maior vulnerabilidade destes tecidos ao herbicida a curto prazo. É provável que a exposição crônica possa elevar o dano e provocar maiores alterações em outros tecidos. Os resultados obtidos neste trabalho servirão de subsídios para novas pesquisas com ensaios toxicológicos com o herbicida 2,4-D, e irão auxiliar na compreensão dos comportamentos morfométricos, histológicos, hematológicos e bioquímicos para os juvenis da espécie *Rhamdia quelen*, expostos a uma contaminação aguda pelo herbicida 2,4-D.

Palavras-chave: Jundiá, histologia, hematologia, lipoperoxidação, Acetilcolinesterase

ABSTRACT

One of the herbicides most commonly used in agriculture is 2,4 dichlorophenoxyacetic acid, its indiscriminate use has generated an increase in water pollution, causing great environmental concerns. The objective of the present study was to determine the toxicological effects of the herbicide 2,4-D in juveniles of *Rhamdia quelen* (jundiá). To this end, 96 specimens of *Rhamdia quelen* were subjected to an acute test (96h) of exposure to the 2,4 D herbicide at increasing concentrations of 0.0; 15; 30 and 45 mg / L. For each concentration, 4 replicates were made, with 6 specimens each. After 96 hours, the animals were weighed, measured and anesthetized for blood collection for hematological analysis, being quantified: the number of erythrocytes, leukocytes, thrombocytes and monocytes. Then, the animals were euthanized and laparotomized to collect the muscles and livers for histomorphometric and biochemical analyzes. For histomorphometry, liver and muscle were isolated clean and weighed and submitted to routine histological techniques, stained and evaluated for the hepatosomatic index (IHS) and condition factor (HR). A liver fragment was used for enzymatic analysis of LPO, AChE and PT. Hematological analyzes showed that 2,4-D causes changes in the number of leukocytes, monocytes and thrombocytes, in all concentrations compared to the control group (not exposed). The mean value of erythrocytes was $1.6 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$. 2,4-D did not significantly change the diameter of muscle fibers ($p \leq 0.05$), but the herbicide at concentrations of 30 and 45 mg / L reduced and increased, respectively, the number of hepatocytes when compared to the control group (not exposed). The activity of hepatic OLP was not altered by 2,4-D at any concentration used. Similarly, there was no evidence of inhibition of hepatic acetylcholinesterase (AChE) activity in animals exposed to 2,4-D ($p \leq 0.05$). However, at concentrations of 30 and 45 mg/L of 2,4-D, a reduction in total protein was observed. The changes found in *Rhamdia quelen* exposed to 2,4-D indicate that, acutely, exposure to the herbicide mainly promotes liver and hematological damage, indicating greater vulnerability of these tissues to the herbicide in the short term. Chronic exposure is likely to increase damage and cause further changes in other tissues. The results obtained in this work will serve as subsidies for further research with toxicological tests with the herbicide 2,4-D, and will assist in the understanding of morphometric, histological, hematological and biochemical behaviors for juveniles of the species *Rhamdia quelen*, exposed to acute contamination by the 2,4-D herbicide.

Keywords: Jundiá, histology, hematology, lipoperoxidation, acetylcholinesterase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Taxa de Sobrevivência (%), ocorrida nos grupos, submetidos ao 2,4-D, durante o experimento.....26
- Figura 2.** Médias \pm erro padrão para os juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, durante o período de 96 horas. A) Índice hepatossomático (IHS) e B) Fator de condição (FC) (N=8).....28
- Figura 3.** Fotomicrografia, do fígado de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações do 2,4-D. (A) grupo controle, imagem normal do fígado, com parênquima hepático íntegro com VCL, cordões de hepatócitos (seta preta) e capilares sinusoides (seta azul), (B) grupo de 15mg/L, (C) grupo de 30 mg/L e (D) grupo de 45 mg/L, imagens com redução do número de hepatócitos. HE, objetiva 40x.....29
- Figura 4.** Fotomicrografia de Corte transversal das fibras musculares de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações do 2,4-D, A) grupo controle, imagem com miofibrilas íntegras (setas pretas) e mionúcleos (setas azuis); B) grupo de 15mg/L; C) grupo de 30mg/L e D) grupo de 45mg/L, estruturas íntegras para todos os grupos. HE, Objetiva de 40x.....30
- Figura 5.** Médias \pm erro padrão para os juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, durante o período de 96 horas. A) Número de hepatócitos e B) Fibras musculares letras diferentes acima das barras indicam diferenças ($p \leq 0,05$; N=8).....32
- Figura 6.** Médias \pm erro padrão para os juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, durante o período de 96 horas. A) Lipoperoxidação e B) Acetilcolinesterase, e C) Proteínas Totais. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. (N=8).....34
- Figura 7.** Fotomicrografia das células sanguíneas de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações do 2,4-D, A) Eritrócitos, B) Leucócitos, C) Linfócitos, D) Neutrófilos, E) Monócitos e F) Trombócitos. Panótico, Objetiva de 100x.....48
- Figura 8.** Resultado da Análise não paramétrica para Eritrócitos (A) e Leucócitos (B) expressos em mediana, 1° e 2° quartil e mínimo e máximo), para juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a ensaio toxicológico com o 2,4 -D. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes, com um nível de confiança de $p \leq 0,05$ (N=8).....50
- Figura 9.** Resultados da Análise não paramétrica para Linfócitos (A) e Neutrófilos (B), expressos em mediana, 1° e 2° quartil, mínimo e máximo, para *Rhamdia quelen*, submetidos a ensaio toxicológico com o 2,4 -D. Letras diferentes, indicam valores significativamente diferentes, com um nível de confiança de $p \leq 0,05$. (N=8).....51
- Figura 10.** Resultado da Análise não paramétrica para Monócitos (A) e Trombócitos (B), expressos em mediana, 1° e 2° quartil, mínimo e máximo, para *Rhamdia quelen*, submetidos a ensaio toxicológico com o 2,4 -D. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes, com um nível de confiança de $p \leq 0,05$. (N=8).....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos da água, medidos durante o período de realização do ensaio toxicológico de jundiá, com diferentes concentrações de 2,4-D (0,00mg/L; 15mg/L; 30mg/L e 45mg/L)26

Tabela 2: Valores dos parâmetros sanguíneos, em 1° e 2° quartil, mediana, mínimo e máximo, obtidos nos diferentes tratamentos com 2,4-D, aplicados aos juvenis de *Rhamdia quelen*.....49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL – Microlitro
μm – Micrómetro
2,4-D - 2,4-diclorofenoxiacético
AChE - Acetilcolinesterase
ANOVA – Análise de variância
BSA – Soro Albumina bovina
FC- Fator de Condição
g – grama
IHS – Índice Hepatosomático
L – Litro
LPO – Lipoperoxidação Oxidativa
mg - Miligrama
nmol – Nanomol
OD – Oxigenio dissolvido
pH – Potencial hidrogeniônico

Sumário

1. Introdução Geral	13
2. Referências	15
Capítulo 1	19
3. Introdução	22
4. Materiais e Métodos	23
4.1. Local	23
4.2. Peixes.....	23
4.3. Desenho Experimental.....	24
4.4. Taxa de Sobrevivência.....	24
4.5. Análises Histológicas	25
4.6. Análises Bioquímicas	25
4.7. Análises Morfométricas.....	26
4.8. Análises Estatísticas	26
5. Resultados e Discussão	26
6. Conclusão	35
7. Referências	36
Capítulo 2	43
8. Introdução	46
9. Materiais e Métodos	47
9.1. Local	47
9.2. Peixes.....	47
9.3. Desenho Experimental.....	47
9.4. Análises Hematológicas	48
9.5. Análises Estatísticas	48
10. Resultados e Discussão	48
11. Conclusão	54
12. Referências	54

1. Introdução Geral

Os agrotóxicos tem sido formulados para eliminar algumas formas de vida, sobretudo aquelas que causam prejuízo às culturas agrícolas, diminuindo a eficiência da produção, entretanto, são os contaminantes aquáticos mais perigosos decorrentes das atividades antropogênicas. O uso indiscriminado destes agrotóxicos frequentemente atinge espécies não alvo de modo letal, reduzindo a biodiversidade e contribuindo para um desequilíbrio ambiental. Estes compostos químicos provocam impactos em vários níveis de organização, incluindo molecular, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades (GRISOLIA, 2005). Os agrotóxicos são encontrados em todo ambiente, incluindo solo, vegetação e no meio aquático em doses letais ou sub-letais. Neste sentido, é frequente a presença de agrotóxicos em lençóis freáticos e rios, nos quais podendo provocar alterações estruturais e fisiológicas nos organismos vivos, em especial nos peixes. No entanto, a dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente é variadas, pois depende de suas propriedades físico-químicas, das características do solo, condições climáticas e ambientais (REBELO; CALDAS, 2014).

Dentre os agrotóxicos se destaca o herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) pertence ao grupo dos químicos fenoxiacéticos, que tem atuação semelhante ao das auxinas sintéticas, sendo classificado como um herbicida hormonal eficaz no controle de plantas daninhas da classe das eudicotiledôneas (SHAW; ARNOLD, 2002). Por ser muito utilizado na agricultura, o 2,4-D pode apresentar riscos após sua aplicação, ocasionando danos ambientais, principalmente devido à contaminação do solo e de águas subterrâneas, além de ocasionar problemas em áreas próximas com cultivo de culturas sensíveis a esse produto (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2007; FU et al., 2009). A aplicação direta nos corpos d'água para controle de macrófitas competidoras, também pode atingir outros organismos aquáticos (SESIN et al., 2018).

Nos peixes, quando entram em contato com algum contaminante, mudanças ambientais ou fisiológicas são capazes de promover ajustes biológicos, histológicos e funcionais com o intuito de minimizar os efeitos advindo do estresse ambiental. Tais respostas adaptativas ao ambiente podem ser primárias, secundárias ou terciárias (BARTON; IWANA, 1991), sendo a magnitude dos efeitos nos organismos aquáticos, avaliados pela mortalidade (efeito letal), por alterações no crescimento, patológico, bioquímico e fisiológico (efeitos subletais), essas alterações caracterizam o efeito tóxico (WHO, 1993). Em virtude disso, os peixes têm sido amplamente utilizados como modelos experimentais, em avaliações de estudos toxicológicos.

Além dos peixes os organismos-testes podem ser também algas, microcrustáceos, microrganismos, entre outros organismos aquáticos (COSTA et al., 2008).

Entre os peixes de água doce neotropicais, a espécie *Rhamdia quelen* é um Siluriforme, encontrado desde o centro da Argentina até o sul do México, e foi utilizado como modelo na presente análise. Na região Sul do Brasil o cultivo em cativeiro desta espécie tem crescido, principalmente devido a sua reprodução induzida, apresentar bons resultados e altas taxas de fecundação (GOMES et al., 2000). Por exemplo, Miron et al., (2005) realizou estudo com *Rhamdia quelen* para avaliar o potencial tóxico dos herbicidas clomazone, quinclorac e metsulfuron methyl.

A partir do desenvolvimento de métodos mais sensíveis, que utilizam biomarcadores é possível detectar e mensurar concentrações em níveis vestigiais de contaminantes no ambiente aquático (FAWEL; ONG, 2012; ARCHER et al. 2017). Assim, um indicador biológico, fornece evidências quando expostos a um agente estressor, essas alterações podem ser interpretadas como um evento adaptativo não patogênico, ou como alterações de um evento funcional, dependendo da toxicocinética do contaminante (DECAPRIO, 1993). Deste modo, este trabalho foi conduzido levando-se em consideração os bioindicadores, que são comumente utilizados para fornecer uma resposta dos animais expostos à um determinado contaminante.

Estes indicadores biológicos revelam perturbações na homeostase do organismo em resposta à um xenobionte. A homeostase é a capacidade que um organismo tem de manter o seu meio interno em equilíbrio, podendo sofrer alterações em decorrência de fatores biológicos internos ou externos, portanto é uma excelente ferramenta para avaliar o impacto de contaminantes químicos sobre a biota (RODRIGUES et al., 2014).

Outro biomarcador amplamente utilizado é o histológico que fornece um diagnóstico dos efeitos agudos e crônicos, provocados por agentes químicos sobre os peixes (AKAISHI et al., 2004). Essa ferramenta permite uma avaliação relativamente rápida, das alterações teciduais em vários órgãos dos peixes (JOHNSON et al., 1993).

Por outro lado, a hematologia é um biomarcador essencial da toxicologia, com potencial para determinar, os riscos para saúde animal e ambiental, e pode ser integrada a outras ciências para uma avaliação mais completa (EVANS, 2008). A exposição a um contaminante ocasiona uma série de alterações dos constituintes sanguíneos, porém as respostas hematológicas são diferenciadas, de acordo com os estímulos aos quais os peixes são submetidos, assim como diferenças relacionadas à biologia e ecologia da mesma (SERIANI; RANZANI-PAIVA, 2012).

Um biomarcador muito importante no processo de avaliação toxicológica é o bioquímico, que tem a capacidade de fornecer respostas importantes a nível de enzimas, é a lipoperoxidação oxidativa, que é denominada de produtos de danos oxidativo (BARBOSA et al., 2010, RUSSO; BRACARENSE, 2016). A acetilcolinesterase também é muito importante no processo de avaliação de diversos efeitos primários no organismo, por apresentar uma sensibilidade elevada em exposição à organofosforados e carbamatos, sendo muito utilizada em estudos com peixes ((LIONETTO et al., 2003; SANCHO, CERÓN, FERRANDO, 2000; STIEN et al., 1998).

Atualmente existem literaturas sobre os biomarcadores histológicos, hematológicos, bioquímicos (avaliação de enzimas) para diagnósticos de alterações toxicológicas em peixes teleósteos, no entanto, pouco se conhece sobre a influência do estresse por exposição ao 2,4-D na fisiologia do *R. quelen*, para as concentrações utilizadas. Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico do herbicida 2,4-D nos juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações.

2. Referências

AKAISHI, F. M., et. al. **Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 46 (2), p. 244-253, 2004.

ARCHER, E.; PETRIE, B.; KASPRZYK-HORDEN, B.; WOLFAARDT, G. M. **The fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters,** Chemosphere, v. 174, p. 437 – 446, 2017.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R. & BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Revista de Nutrição, v. 23, 629-643.210.

BARTON, B.A. & IWAMA, G.K. **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.** Annual Reviews on Fish Diseases, Vancouver, v.10, p. 3-26, 1991.

COSTA, C. R.; OLIVI, P; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. **A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação.** Química Nova, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DECAPRIO, A.P. **Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment.** Environmental Science Technology, v.(31), p.1837-1848, 1997.

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

FAWELL, J.; ONG, C. N. **Emerging Contaminants and the Implications for Drinking Water.** International Journal of Water Resources Development, v. 28, n. 2, p.247-263, 2012.

GOMES, L.C. et al. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

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

JOHNSON, L. L., STEHR, C. M., OLSON, O. P., MYERS, M. S., PIERCE, S. M., WIGREN, C. A., MCCAIN, B. B., VARANASI, U. **Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States.** Environmental Science and Technology, v. 27 (13), p. 2759-2771, 1993.

LIONETTO, M.G. et al. **Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area.** Marine Pollution Bulletin. v. 46: 324-330 p. 2003.

MIRON D. S. et al. **Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae).** Ecotoxicol Environ Saf. v. 61(3):398-403 p. 2005.

OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTI, J.; FILHO, B.; CALLEGARI, O.; PAGLIARI, P. H.; CAVALIERI, S. D. **Efeito de sub-doses de 2,4-D na produtividade de uva Itália e susceptibilidade da cultura em função de seu estágio de desenvolvimento.** Engenharia Agrícola, Maringá, v. 27, p. 35 - 40, 2007.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. **Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos.** Quím. Nova, v. 37, p. 1199–1208, 2014.

RODRIGUES, S.; CORREIA, A. T.; ANTUNES, S. C.; NUNES, B. **Alterations in gills of *Lepomis gibbosus*, after acute exposure to several xenobiotics (pesticide, detergent and pharmaceuticals): morphometric and biochemical evaluation.** Drug and Chemical Toxicology, p. 1-7, 2014.

RUSSO, C. & BRACARENSE, A. P. F. R. L. 2016. **Oxidative stress in dogs.** Semina: Ciências Agrárias, 37, 1431-1440.

SANCHO, E, CERÓN, JJ, FERRANDO, MD. **Cholinesterase Activity and Hematological Parameters as Biomarkers of Sublethal Molinate Exposure in *Anguilla anguilla*.** Ecotoxicology and Environmental Safety v. 46: 81-86 p. 2000.

SERIANI, R. & RANZANI-PAIVA, M.J.T. **Alterações hematológicas em peixes: Aspectos fisiopatológicos e aplicações em ecotoxicologia aquática** In: SILVA-SOUZA, A.T.; PEREZ LIZAMA, M. A.; TAKEMTO, R.M. (Org). Patologia e sanidade de organismos aquáticos. Maringá: ABRAPOA, 221-242 p, 2012.

SESN, V.; DALTON, R.L.; BOUTIN, C.; ROBINSON, S. A.; BARTLETT, A. J.; PICK, F. R. **Macrophytes are highly sensitive to the herbicide diquat dibromide in test systems of varying complexity.** Ecotoxicol. Environ. Saf., v. 165, p. 325–333, 2018.

SHAW, D.R.; ARNOLD, J.C. **Weed control from herbicide combinations with glyphosate.** Weed Technology, Lawrence, v. 16 (1), p. 1 - 6, 2002.

STIEN, X, PERCIC, P, GNASSIA-BARELLI, M, ROMÈO, M, LAFAURIE, M. **Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea.** *Environmental Pollution* 1998; 99: 339-345.

Avaliação da toxicidade aguda do herbicida 2,4 diclorofenoxiacético em juvenis de *Rhamdia quelen*

Vanilva Pereira de Oliveira¹; Gilmar Baumgartner¹; Sabrina Grassioli^{2,3} e Camila Maria Toigo de Oliveira Piffero²

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus Toledo, Rua da Faculdade, 645 - Jardim La Salle, CEP 85903-000. Toledo – PR, Brasil.

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná, PPG-Biociências e Saúde; ua. Universitária, 1619 – Jardim Universitário, CEP 85819-110. Cascavel - PR – Brasil.

³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, PPG-Ciências Aplicadas a Saúde – Campus Francisco Beltrão, PR, Brasil.

Revista: Archives of Environmental Contamination and Toxicology Disponível em >

<https://www.springer.com/journal/244>

RESUMO

Os agrotóxicos são agentes químicos usados para combater pragas indesejáveis, quando aplicados em doses excessivas podem atingir ambientes aquáticos e causar danos a biota. O objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros morfométricos, histológicos e bioquímicos, em juvenis de *Rhamdia quelen* (Jundiá), submetidos a concentrações crescentes do herbicida 2,4-D. Para tal, foi realizado um teste toxicológico agudo com duração de 96 horas. Os exemplares (n=96) de *R. quelen* foram submetidos a concentrações crescentes do 2,4-D (0,0; 15; 30 e 45 mg/L), sendo para cada concentração testadas 4 réplicas, com 6 exemplares cada. Após o término, os animais foram eutanasiados e laparatomizados para a coleta dos músculos e fígados destinados às análises histomorfométricas e bioquímicas. Para histomorfometria, fígado e músculo foram isolados, pesados e fixados em formaldeído 10%, preservados em álcool 70% e posteriormente submetidos à técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. Para histomorfometria, fígado e músculo foram isolados limpos e pesados sendo submetidos a técnicas histológicas de rotina, corados e avaliados quanto ao Índice hepatossomático (IHS) e Fator de condição (FC). Um fragmento hepático, foi destinado análise enzimática da LPO, AChE e PT. A exposição ao 2,4-D independente da concentração não alterou significativamente o diâmetro das fibras musculares ($p \leq 0,05$), porém nas concentrações de 30 e 45mg/L provocou uma redução, seguida de um aumento do número de hepatócitos, quando comparado ao grupo controle (não exposto). A atividade da LPO hepática não foi alterada pelo 2,4-D em nenhuma concentração estudada. Similarmente, não foi evidenciado inibição da atividade da Acetilcolinesterase (AChE) hepática nos animais expostos a 2,4-D ($p \leq 0,05$). Todavia, em concentrações 30 e 45mg/L do 2,4-D foram observadas reduções das proteínas totais. As alterações encontradas em *Rhamdia quelen* expostos a 2,4-D indicam que, agudamente a exposição ao herbicida promove principalmente danos nos fígados e proteínas totais, indicando maior vulnerabilidade destes tecidos e das proteínas a curto prazo. É provável que exposição crônica possa elevar o dano e provocar maiores alterações em outros territórios. Os resultados obtidos neste trabalho servirão de subsídios para novas pesquisas com ensaios toxicológicos com o herbicida 2,4-D, e irão auxiliar na compreensão dos comportamentos morfométricos, histológicos, hematológicos e bioquímicos para os juvenis da espécie *Rhamdia quelen*, expostos a uma contaminação aguda pelo herbicida 2,4-D.

Palavras-chave: Jundiá, histologia, lipoperoxidação, acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Pesticides are chemical agents used to combat undesirable pests, when applied in excessive doses they can reach aquatic environments and cause damage to biota. The objective of the study was to evaluate the morphometric, histological and biochemical parameters, in juveniles of *Rhamdia quelen* (Jundiá), submitted to increasing concentrations of the herbicide 2,4-D. To this end, an acute toxicological test lasting 96 hours was performed. The specimens (n = 96) of *R. quelen* were subjected to increasing concentrations of 2,4-D (0,0; 15; 30 and 45 mg / L), with 4 replicates being tested for each concentration, with 6 specimens each. After completion, the animals were euthanized and laparatomized for the collection of muscles and livers for histomorphometric and biochemical analyzes. For histomorphometry, liver and muscle were isolated, weighed and fixed in 10% formaldehyde, preserved in 70% alcohol and subsequently subjected to the routine histological technique for inclusion in paraffin. For histomorphometry, liver and muscle were isolated clean and weighed and submitted to routine histological techniques, stained and evaluated for the hepatosomatic index (IHS) and condition factor (HR). A liver fragment was used for enzymatic analysis of LPO, AChE and PT. Exposure to 2,4-D regardless of concentration did not significantly change the diameter of muscle fibers ($p \leq 0.05$), but at concentrations of 30 and 45mg / L it caused a reduction, followed by an increase in the number of hepatocytes, when compared to the control group (not exposed). The activity of hepatic OLP was not altered by 2,4-D at any concentration studied. Similarly, there was no evidence of inhibition of hepatic acetylcholinesterase (AChE) activity in animals exposed to 2,4-D ($p \leq 0.05$). However, in concentrations 30 and 45mg / L of 2,4-D, reductions in total proteins were observed. The changes found in *Rhamdia quelen* exposed to 2,4-D indicate that, acutely, exposure to the herbicide mainly promotes damage to livers and total proteins, indicating greater vulnerability of these tissues and proteins in the short term. Chronic exposure is likely to increase the damage and cause further changes in other territories. The results obtained in this work will serve as subsidies for further research with toxicological tests with the herbicide 2,4-D, and will assist in the understanding of morphometric, histological, hematological and biochemical behaviors for juveniles of the species *Rhamdia quelen*, exposed to acute contamination by the 2,4-D herbicide.

Keywords: Jundiá, histology, lipoperoxidation, acetylcholinesterase.

3. Introdução

Os herbicidas são o grupo de agrotóxicos encontrados em maior frequência nas águas doces brasileiras, por serem aplicados em grandes volumes em áreas extensas de cultivo, podendo ocasionar contaminação ambiental em reservatórios hídricos (FRANCO et al., 2016).

Dentre os herbicidas se destaca o ácido 2,4-D diclorofenoxiacético, que tem gerado grandes preocupações quanto aos aspectos ambientais, por ser um agroquímico utilizado em grande escala, e por apresentar resistência no processo de degradação de suas moléculas, persistindo no ambiente por muito tempo (DIAS et al., 2011). Este herbicida tem sido utilizado por mais de 60 anos e foi o primeiro a ser comercialmente desenvolvido (SONG, 2014).

A qualidade dos sistemas aquáticos e a saúde dos animais, podem ser avaliados através da ecotoxicologia, que se utiliza de biomarcadores para o estudo da poluição ambiental (MIRANDA, 2006). As avaliações possuem cada vez mais novas ferramentas que possibilitam avaliar os impactos diretos e indiretos dos usos de produtos químicos nos ecossistemas. A toxicidade aguda é o efeito que um contaminante provoca em curto prazo, após uma rápida exposição a elevadas concentrações de um contaminante (NRC 2003).

Os testes de toxicidade são ferramentas que possibilitam avaliar os impactos diretos e indiretos do uso de produtos químicos nos ecossistemas, essas análises são indispensáveis no controle de poluição hídrica, pois detectam os efeitos sobre a biota aquática, enquanto as análises químicas fornecem apenas dados sobre as substâncias químicas presentes no ambiente (MASSARO, 2006; RODRIGUES, 2007). Estes testes são muito utilizados na ecotoxicologia aquática, e seguem padrões e metodologias estabelecidas por órgãos normativos nacionais e internacionais, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), “United States Environmental Protection Agency” (USEPA), “European Environment Agency” (EEA), entre outros (SILVA, 2013).

Uma ferramenta muito utilizada para avaliar a exposição a um contaminante em ambientes aquáticos são os biomarcadores, que podem ser bioquímicos, celulares, tecidual, fluidos corporais e parâmetros comportamentais (MONSERRAT et al. 2007). O fígado tem sido amplamente utilizado como biomarcador histológico, e se destaca em estudos ecotoxicológicos com peixes (PAULINO et al., 2020). Outro biomarcador importante é o músculo, também utilizado em testes toxicológicos.

A LPO (Lipoperoxidação) tem a capacidade de evidenciar a perda da integridade da camada lipídica da membrana celular (SAMPAIO & MORAES, 2010), e a AChE, permite a identificação de agentes tóxicos através de sua inibição, ocasionadas principalmente por carbamatos e organofosforados (MONSSERRAT et al., 2002).

A espécie utilizada neste estudo é o *Rhamdia quelen*, conhecido popularmente como jundiá, é um peixe que possui hábito noturno e tem preferência por locais calmos e profundos de rios. Sua distribuição vai da Argentina até o México, é uma espécie endêmica da América do Sul e na região Sul do Brasil seu cultivo é crescente (GOMES et al., 2000). Possui boa adaptação e um bom cultivo, e vem sendo muito utilizada em pesquisas científicas (BARCELLOS et al., 2004). Exemplos de estudos toxicológicos já realizados com esta espécie são: Avaliação do efeito tóxico do fármaco ibuprofeno (OLIVEIRA, 2017), Avaliação dos efeitos do cádmio sobre o metabolismo da espécie (PRETTO, 2008) e efeito do herbicida clomazone para os jundiás (CRESTANI, 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar, possíveis alterações morfológicas e danos histológicos, ocasionados por ação do herbicida 2,4-D e diagnosticar a sua toxicidade para os juvenis de *R. quelen*, pois pouco se conhece sobre a influência do estresse por exposição ao 2,4-D na fisiologia da espécie. Diante deste contexto, este estudo contribui com futuros trabalhos que visam verificar o potencial tóxico do herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) na população de peixes e demais espécies.

4. Materiais e Métodos

4.1. Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual Oeste do Paraná – UNIOESTE/Campus Toledo.

4.2. Peixes

Os exemplares de Jundiá (*Rhamdia quelen*) foram adquiridos em uma piscicultura comercial da região, sendo que foram utilizados 96 indivíduos com peso médio de 17 ± 2 g, e, por um período de 96 horas, estes peixes foram ambientados e alimentados uma vez por dia com ração comercial (40% proteína). Durante este período eles ficaram em observação a fim de monitorar as possíveis variações (estresse, parasitismo e mortalidade) que pudessem

interferir negativamente no experimento. Foram monitorados também os valores de temperatura, pH e oxigênio, os quais se mantiveram dentro da normalidade (Tabela 1), para o cultivo desta espécie.

4.3. Desenho Experimental

Após o período de ambientação, os peixes foram transferidos para 16 aquários com um volume total de 15 litros (L) de água cada, a uma densidade de 6 peixes por aquário e sistema de aeração individual. Durante o experimento os peixes foram alimentados uma vez ao dia e a água utilizada para o ensaio se manteve com um pH entre 7,1 e 7,9.

A exposição ao 2,4-D ocorreu por via hídrica, por um período de 96 horas, sendo que houve troca da água e reposição das concentrações ao completar 48 horas de experimento. As concentrações do herbicida utilizadas foram em miligramas (mg) por L: 15 mg/L; 30 mg/L e 45 mg/L. A maior concentração testada no presente estudo foi previamente utilizada em estudos com mamíferos. O grupo controle não foi exposto ao 2,4-D (0,00 mg/L).

Após o término do experimento, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,001%) e imediatamente com auxílio de ictiômetro e balança digital foi realizada a biometria, sendo registrado o tamanho (cm) e peso corporal (g). Em seguida os peixes foram eutanasiados e laparotomizados para a remoção dos fígados e músculos, que foram limpos e pesados, sendo posteriormente fixados em formaldeído 10%, durante 24 horas, e em seguida transferido para o álcool 70%. Uma porção dos fígados foram devidamente higienizados com etanol 90 %, armazenados em tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL e destinados imediatamente ao ultrafreezer (-80 °C) até a homogeneização das amostras para as análises bioquímicas.

4.4. Taxa de Sobrevivência

Para o cálculo da Taxa de Sobrevivência (TS%) dos animais (), empregou-se a seguinte fórmula, conforme proposto por SANTOS et. al, 2007.

$$TS (\%) = \frac{Nf \times 100}{Ni}$$

Onde:

Nf = número final de indivíduos

Ni = número inicial de indivíduos

4.5. Análises Histológicas

Para as análises histológicas, foram retirados randomicamente, dois peixes por aquário, e anestesiados com benzocaína (100mg/L), para a realização da biometria, em seguida os peixes foram eutanasiados para a coleta dos fígados e músculos (porção média da região dorsal) foram fixados em formol 10% por 24 horas, e posteriormente conservados em álcool 70% por 30 dias (ROCHA et. al., 2010). Após a fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, desde 70% até etanol absoluto, diafanizadas em xilol, infiltradas e incluídas em parafina (DA JANSEN, 2014). Em seguida, foram efetuados os cortes transversais com 6µm de espessura com o auxílio de um micrótomo Olympus cut 4055. Foram confeccionadas duas lâminas para cada peixe, contendo 10 cortes cada, corados com hematoxilina-eosina (H&E). Com os dados da biometria foram realizadas as análises morfométricas (IHS) e (FC). Para as análises histológicas as imagens foram avaliadas em microscópio de luz nas objetivas de 4x, 10x, 40x, 100x. Foi Quantificado o número de hepatócitos e avaliado o grau de hipertrofia e hiperplasia da musculatura, quantificado o menor diâmetro das fibras de acordo com a metodologia de Alami-Durante et al., (2010). Para as lâminas de músculo, foram quantificadas 200 fibras por lâmina conforme descrito em Assis et al. (2004), por um sistema computadorizado de análise de imagem Image Pro Plus (versão 4.5, Media Cybernetics, EUA) e Fiji- ImageJ (<https://imagej.net/Fiji>) (SCHINDELIN et al., 2012).

4.6. Análises Bioquímicas

Para as análises bioquímicas, foram retirados aleatoriamente, dois peixes por aquário, e eutanasiados em benzocaína. Em seguida os fígados foram coletados, uma porção de cada transferida para tubos eppendorf e acondicionadas em ultrafreezer -80°C. Para o preparo as amostra foram inicialmente descongeladas e mantidas em gelo, pesadas e homogeneizadas em tampão tris-HCl pH 7,0, em seguida a uma temperatura de 4°C foram centrifugadas em microcentrífuga por um período de 12 minutos, em seguida acondicionadas novamente no ultrafrizzer para realização das análises. A peroxidação lipídica (LPO) foi analisada através de produtos de reação, onde foram utilizados o ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído, a mensuração dos dados ocorreu por espectrofotômetro a 535 nm e expresso em nmol de MDA.mg-1 de proteína (BUEGE & AUST, 1975). Para a determinação das proteínas totais, as

amostras foram diluídas em tampão (1:20) e foi utilizado soro albumina bovina como padrão. Nos poços da microplaca foram adicionados 10 µL da amostra e 250 µL da solução de Bradford (triplicatas), e a leitura realizada em comprimento de onda de 595 nm (BRADFORD 1976).

Para a análise da Acetilcolinesterase, os fígados foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,5), e centrifugados (20 min), 4°C e o sobrenadante foi retirado para as análises. A atividade da enzima foi determinada com base no método colorimétrico de Ellman et al. (1961) adaptado para leitura em microplaca, de acordo com Alves Costa et al. (2007). A absorbância foi determinada em leitora de microplacas em 415 nm e a atividade da enzima expressa em nmol DTNB.min.mg prot⁻¹. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

4.7. Análises Morfométricas

O índice Hepatosomático (IHS), foi calculado a partir do peso do fígado, de cada animal, em relação ao seu peso total, e expresso em porcentagem. Foi calculado também o fator de condição (FC) dos peixes, que é a relação entre o peso dos animais e seu comprimento total. Ambos os índices foram estimados de acordo com Wootton et al., (1978) seguindo a equações abaixo:

$$IHS = \frac{\text{Peso do fígado}}{\text{Peso total}} \times 100$$

$$FC = \frac{\text{Peso do peixe}}{\text{Comprimento total}} \times 100$$

4.8. Análises Estatísticas

Para todos os parâmetros analisados, foram realizadas análises paramétricas (ANOVA), seguidas de teste de Tukey, para comparação das médias entre os grupos. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. Os dados foram avaliados por meio do programa estatístico Sigma Plot 12.0.

5. Resultados e Discussão

Ao longo do experimento, os parâmetros físico-químicos da água se mantiveram praticamente constantes e dentro das condições ótimas para a espécie, independente do grau de concentração do 2,4 D (Tabela 1). Em relação a temperatura o *Rhamdia quelen*, possui capacidade térmica de suportar variações entre 15 a 34°C, por isso é considerado como uma espécie euritérmica (CHIPPARI-GOMES & GOMES, 1999). Ao final do bioensaio os grupos controle e 15mg/L apresentaram TS de 100%. Entretanto, nas concentrações de 30mg/L e 45mg/L do herbicida, a TS foi reduzida para 95,83% (Figura 1). Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,588$).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos da água, medidos durante o período de realização do ensaio toxicológico de jundiá, com diferentes concentrações de 2,4-D (0,00mg/L; 15mg/L; 30mg/L e 45mg/L).

Parâmetros	Controle	15mg/L	30mg/L	45mg/L
Temperatura da água (°C)	23,5±0,18	23,4±0,15	23,2±0,20	23,6±0,05
pH	7,22±0,11	7,52±0,03	7,59±0,01	7,61±0,05
OD (mg/L ¹)	7,12±0,05	7,13 ± 0,05	7,14 ± 0	7,14± 0
Saturação de O ₂ (%)	76,9±4,85	80,7±4,75	79,9±0,12	75,2±3,92

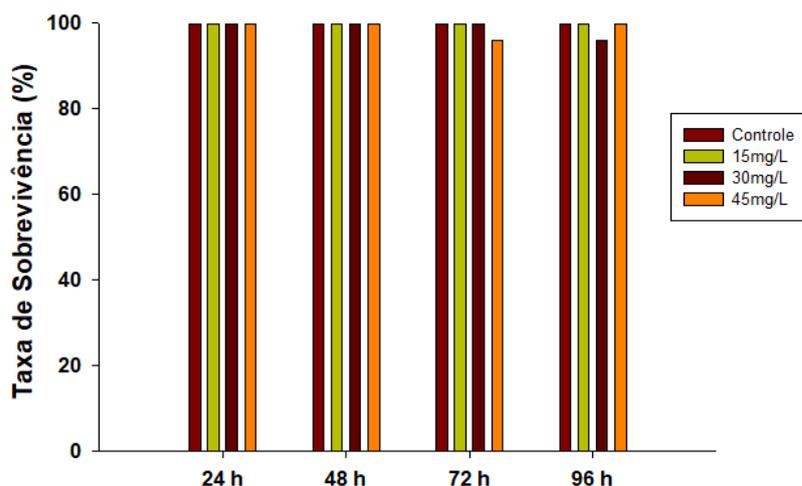


Figura 1. Taxa de Sobrevivência (%), ocorrida nos grupos, submetidos ao 2,4-D, durante o experimento.

Os peixes submetidos a biometria apresentaram em relação aos fígados média \pm desvio padrão de 0,18g ($\pm 0,05$) para o grupo controle; 0,21g ($\pm 0,08$) para o grupo de 15mg/L; para o grupo 30mg/L 0,17g ($\pm 0,07$) e 0,20g ($\pm 0,08$) para o grupo de 45 mg/L, não apresentando diferenças significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$).

O IHS se mostrou uma ferramenta capaz de quantificar o percentual de massa do fígado, ou estoque de energia (glicogênio), em relação ao peso corporal (CYRINO et al., 2000). Os valores médios para o IHS foram de 0,95 ($\pm 0,26$) para o grupo controle, 1,05 ($\pm 0,26$) grupo de 15mg/L; 1,22 ($\pm 0,45$) grupo de 30mg/L e 1,26 ($\pm 0,33$) grupo de 45mg/L, sem diferenças significativas para a exposição de 96 horas ao 2,4-D (Figura 2A), Não apresentando diferenças significativas ($p = 0,739$), quando comparado ao grupo controle. No entanto, trabalhos realizados por Salvo et al. (2008), com a espécie *Cyprinus carpio*, exposta às concentrações subletais do organoclorado endossulfan verificaram alterações neste mesmo índice evidenciando a perda de peso dos fígados, durante exposição ao agente estressor. Para o presente estudo, fica evidenciado que não houve perda de peso significativa nos fígados dos peixes, durante o período de exposição herbicida 2,4-D, que pudesse resultar em alterações neste índice.

O Fator de Condição (FC), também não apresentou diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,763$) (Figura 2B), sendo que a média para cada grupo analisado foi de 154,68 no grupo controle, 165,05 no grupo 15mg/L, 145,93 no grupo de 30mg/L e 149,04 no grupo de 45mg/L. Para Figueiredo-Fernandes (2007), quando ocorrem alterações neste índice, pode ser um indicativo de efeitos tóxicos nos organismos avaliados. Para a espécie *R. quelen*, submetida ao 2,4-D. O período em que os peixes foram submetidos às concentrações crescentes do herbicida, não foi suficiente para registrar uma perda de massa corpórea significativa, por isso não houve diferença entre os grupos para este índice.

Apesar de o IHS e o FC fornecerem dados importantes sobre as condições da espécie, não apresentaram diferenças para este trabalho, o que evidencia que a duração do experimento e as concentrações não foram suficientes para causar as alterações nestes índices. Diante deste contexto, outras análises se fizeram necessárias para complementar os estudos toxicológicos em peixes.

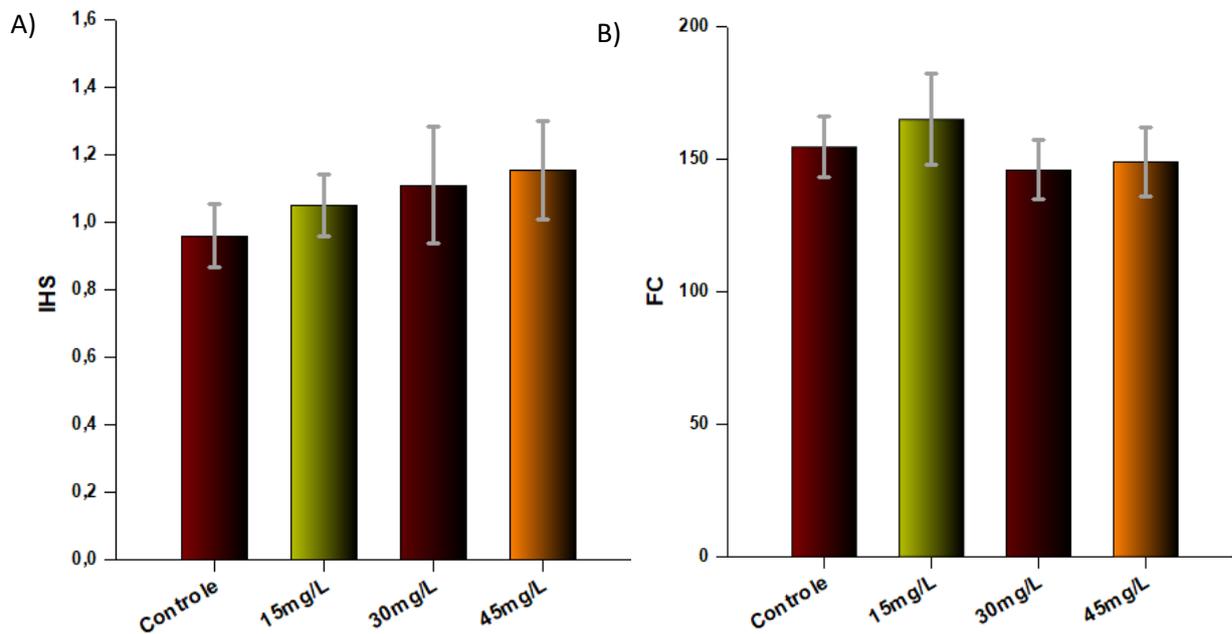


Figura 2. Médias \pm erro padrão para os juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, durante o período de 96 horas. A) Índice hepatossomático (IHS) e B) Fator de condição (FC) (N=8).

Os hepatócitos (Figura 3A) apresentaram formato poligonal com núcleo esférico e centralizado, disposição do parênquima hepático constituído pela veia centro lobular (VCL) circundado por cordões de hepatócitos e por capilares sinusoides, todas integras para o grupo controle (não exposto ao herbicidas). Para os grupos submetidos a concentração crescente do 2,4-D, observou-se que, houve redução do número de hepatócitos (Figura 3), para as diferentes concentrações, o parênquima estava desorganizado, os hepatócitos apresentavam-se hipertrofiados com perda da integridade citoplasmática, o núcleo era visível e pouco centralizado resultados semelhantes aos achados histológicos em estudo realizados por (ROCHA, 2010).

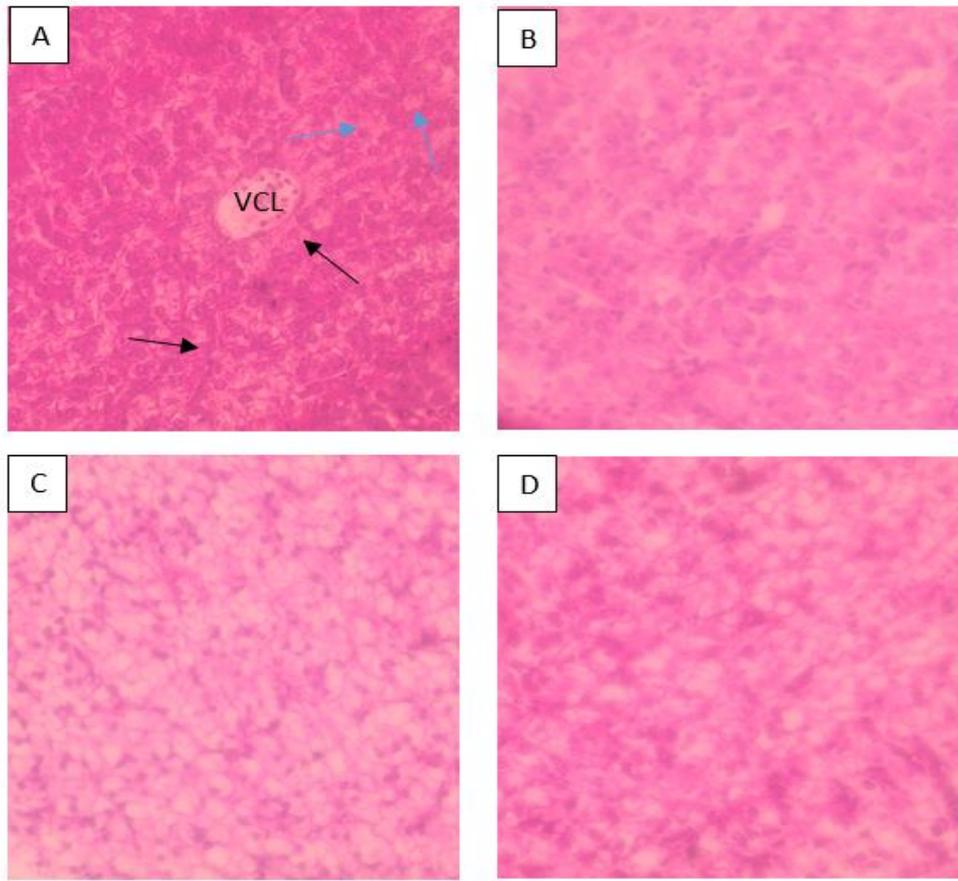


Figura 3. Fotomicrografia, do fígado de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações do 2,4-D. (A) grupo controle, imagem normal do fígado, com parênquima hepático íntegro com VCL, cordões de hepatócitos (seta preta) e capilares sinusoides (seta azul), (B) grupo de 15mg/L, (C) grupo de 30 mg/L e (D) grupo de 45 mg/L, imagens com redução do número de hepatócitos. HE, objetiva 40x.

Para as imagens histológicas dos músculos (Figura 4) é possível observar por meio de cortes axiais das fibras musculares, que não foram evidenciado atrofia, hipertrofia e mudanças nas tramas das miofibrilas dos peixes, durante o período de exposição as concentrações crescentes do herbicida. No músculo normalmente as fibras têm diâmetro regular, e acomodam-se umas às outras tomando cortono poligonal com ângulos arredondados. Frente a um insulto a fibra muscular esquelética tem capacidades adaptativas, mas a resposta à lesão basicamente consiste em necrose e regeneração. Nesses processos pode haver atrofia ou hipertrofia das miofibrilas. (FERREIRA JUNIOR, 2018). O mionúcleo é localizado logo abaixo do sarcolema em fibras normais, e em fibras alteradas a indicação primária e a migração do mionúcleo para o centro da miofibra (ROBERTS & RODGER, 2012). As descrições correspondem aos achados para este estudo, indicando que as fibras possuem estruturas histológicas íntegras.

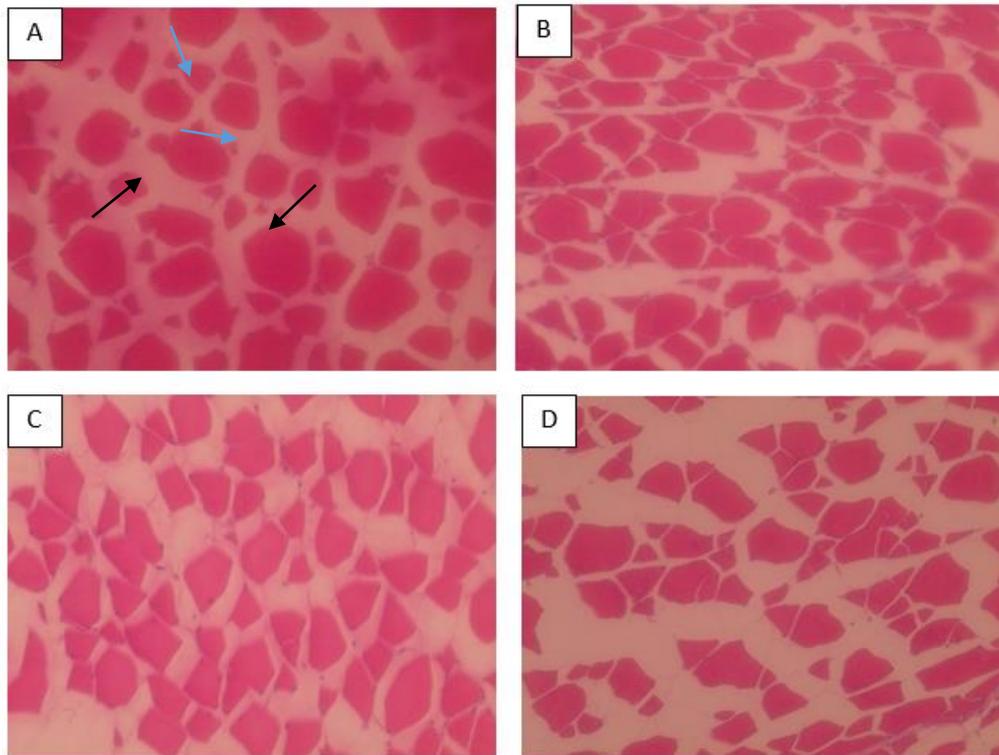


Figura 4. Fotomicrografia de Corte transversal das fibras musculares de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações do 2,4-D, A) grupo controle, imagem com miofibrilas integras (setas pretas) e mionúcleos (setas azuis); B) grupo de 15mg/L; C) grupo de 30mg/L e D) grupo de 45mg/L, estruturas integras para todos os grupos. HE, Objetiva de 40x.

Com relação aos hepatócitos, observou-se efeitos opostos nas maiores concentrações do 2,4-D, sendo que na concentração de 30mg/L foi observada queda significativa no número de núcleos hepáticos, enquanto na concentração de 45mg/L, foi registrada elevação do número de núcleos hepáticos (Figura 5A). Esta variação pode estar ligada aos mecanismos que controlam a multiplicação dos hepatócitos e conseqüentemente a uma maior incidência de necrose, o que leva a morte celular e induz o aumento da multiplicação dos hepatócitos, proliferação hepatocelular, resultante de qualquer alteração patológica ou experimental (MILNE, 1909). Deste modo, o declínio observado no grupo de 30mg/L, se explica pelo fato dos hepatócitos serem considerados o primeiro alvo da toxicidade de substâncias, o que aumenta a utilização do fígado como biomarcador de poluição (ZELIKOFF, 1998). Como são células responsáveis pelo processo de metabolização de diversas substâncias no organismo (MENKE et al. 2011), com o processo de metabolização do herbicida ocorreu a morte dessas células, o que provocou redução nesta concentração comprometendo o funcionamento do órgão, que é responsável por converter toxinas em formas inativas. Esse evento é conhecido como comportamento

quadrático, quando o resultado é mais expressivos em uma dose menor, dose-resposta em forma de “U” oposto ao esperado, observado para este estudo, onde na concentração de 30mg/L, ao reduzir o número de hepatócitos ativa o mecanismo de proliferação das células, para a concentração mais elevada 45mg/L. Este comportamento já foi observado em outros estudos (OLIVEIRA et. al., 2010; ROTILI et. al., 2012).

Na contagem de fibras musculares (Figura 5B), não houve diferença significativa entre os grupos submetidos ao herbicida 2,4-D, em relação ao grupo controle. De acordo com Valentine (2017), na presença de um agente estressor, as fibras musculares esqueléticas tem capacidade adaptativa, mas basicamente apresentam como respostas, uma lesão, necrose e adaptação, sendo que neste processo pode ocorrer atrofia ou hipertrofia das miofibras. O sistema muscular apresenta várias portas de entrada, dentre estas a via hematogena que carrega patógenos, toxinas, células inflamatórias, autoanticorpos e imunocomplexos. Deste modo, um processo adaptativo pode ter ocorrido na presença do 2,4-D, em decorrência do tempo e das concentrações nas quais o peixes foram expostos, o que explicaria os resultados encontrados.

Durante as condições normais dos animais, há um balanço entre a síntese e degradação do tecido muscular, o que mobiliza as proteínas em um fluxo constante, esse processo é chamado de turnover proteico, que é responsável pelo aumento ou consumo (atrofia) do tecido muscular, isso pode acontecer devido a diminuição da taxa de síntese proteica no músculo (TEIXEIRA et al 2012).

Para este estudo as fibras não sofreram danos e o seu tamanho não sofreu variação. A média do diâmetro das fibras musculares para cada grupo foi de (18,86 μ m) para o grupo controle, (18,03 μ m) grupo de 15mg/L, (19,27 μ m) grupo de 30mg/L e (17,67 μ m) grupo de 45mg, se mantendo no tamanho ideal para a fase juvenil da espécie. Os peixes são compostos predominantemente por fibras brancas, estas fibras compreendem mais de 70% da massa muscular e são as que atingem maior diâmetro de 50 à 100 μ m, esse musculo varia ao longo do comprimento dos peixes e maior na região anterior, e menor na região posterior próximo nadadeira caudal (SANGER & STOIBER, 2001).

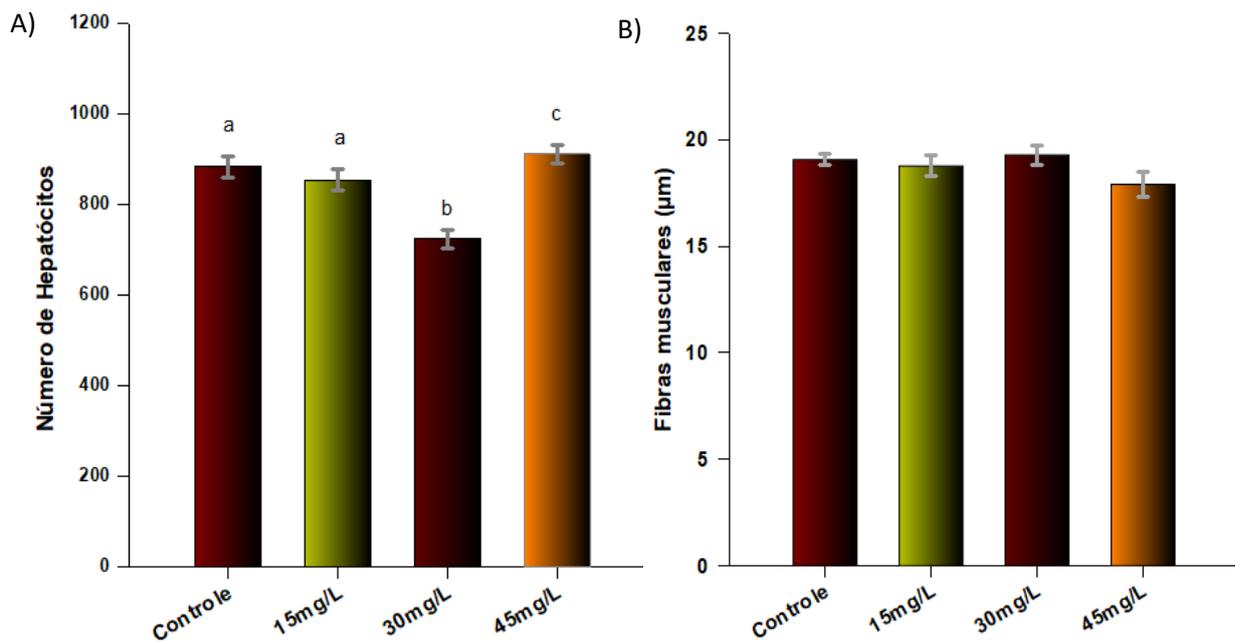


Figura 5. Médias \pm erro padrão para os juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, durante o período de 96 horas. A) Número de hepatócitos e B) Fibras musculares letras diferentes acima das barras indicam diferenças ($p \leq 0,05$; $N=8$).

Para os peixes submetidos ao herbicida 2,4-D, não houve diferença entre os grupos ($p \leq 0,05$) quanto a lipoperoxidação, o que indica que não houve redução da atividade do sistema antioxidante e nem aumento da reação (Figura 6A), assim o herbicida não ocasionou danos a membrana celular e nem estresse oxidativo. Apesar de serem evidenciadas alterações para a LPO em outros estudos com *Rhamdia quelen* submetidos aos agrotóxicos metilparation, glifosato e tebuconazole, onde foi evidenciado aumento das reações oxidativas (FERREIRA et al., 2010), na presente análise isso não foi registrado. Há que se destacar que as células possuem vários mecanismos capazes de diminuir a toxicidade das moléculas tóxicas, porém se a concentração das moléculas tóxicas saturarem os sítios ativos das enzimas, podem ocorrer injúrias, como alterações nas atividades enzimáticas (WEISS, 1961), e lesões ao nível celular (SHAN & JONES, 1990). As alterações estruturais e funcionais da membrana, comprometem o seu funcionamento, provocando a perda de integridade, permeabilidade e fluidez, podendo levar à morte celular (SAMPAIO E MORAES, 2010). Para os grupos avaliados neste estudo, ficou evidenciado que não houve danos quanto a integridade da membrana, o que caracterizou a ausência de um evento citotóxico primário.

A Acetilcolinesterase (Figura 6B) não sofreu processo inibitório neste estudo, não apresentou diferenças significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$), no entanto em estudos com outros

herbicidas clomazone (isooxazolidinone), quincorac (quinoline) e metilsulfuron (sulfonilurea) em diferentes concentrações os jundiás (*Rhamdia quelen*), apresentaram inibição da enzima em resposta a estes compostos. Em estudos com clomazone observou-se inibição da atividade da enzima no cérebro e no músculo, em todas as concentrações utilizadas, enquanto o quincorac e o metilsulfuron aumentaram a atividade no cérebro e diminuíram-na no músculo (MIRON et al., 2005). Em estudos com *O. niloticus*, a AChE avaliada em fígados de juvenis, foi inibida em exposição ao diazinom (SILVA 2012).

Quando avaliados os níveis de proteínas totais (Figura 6C), verificou-se diferença entre os grupos submetidos ao herbicida ($p \leq 0,05$), essa alteração sugere que outras enzimas não avaliadas neste estudo podem ter o seu padrão de atividades alterados. A queda nos níveis de proteína foram mais expressivas para os grupos de 30 e 45mg/L, podendo indicar diferenças no ciclo celular, o que provoca uma diminuição de células ou do seu volume. Existem três sistemas de degradação proteica: (1) Proteases cálcio ativadas (calpains ou caspases); (2) Degradação lisossomal e (3) Via proteassoma ubiquitina (P-Ub), dependente de ATP. No fígado o sistema lisossomal é predominante e quando ocorre a degradação proteica é aumentada, e os três sistemas estão envolvidos. No músculo esquelético, esse sistema é responsável por degradar apenas as proteínas sarcoplasmáticas, sendo as proteínas miofibrilares degradadas principalmente via proteassoma-ubiquitina (MENOSSI, 2014), porém, as estratégias proteolíticas de degradação muscular nos peixes ainda são poucos conhecidas (WANG et al. 2010).

A redução dessas proteínas para os grupos de 30 e 45mg/L, indicam a diminuição na atividade energética nestes grupos, de modo que as alterações mostram carência nutricional, já que são marcadores do estado nutricional proteicos, e a queda nos níveis de proteína pode comprometer o funcionamento do organismo. Este resultado concorda com Sampaio (2012), que afirma que em ensaios toxicológicos a síntese e função dessas proteínas podem ficar comprometidas, tendo os valores reduzidos, em situações de estresse, infecção/inflamação e doenças hepáticas.

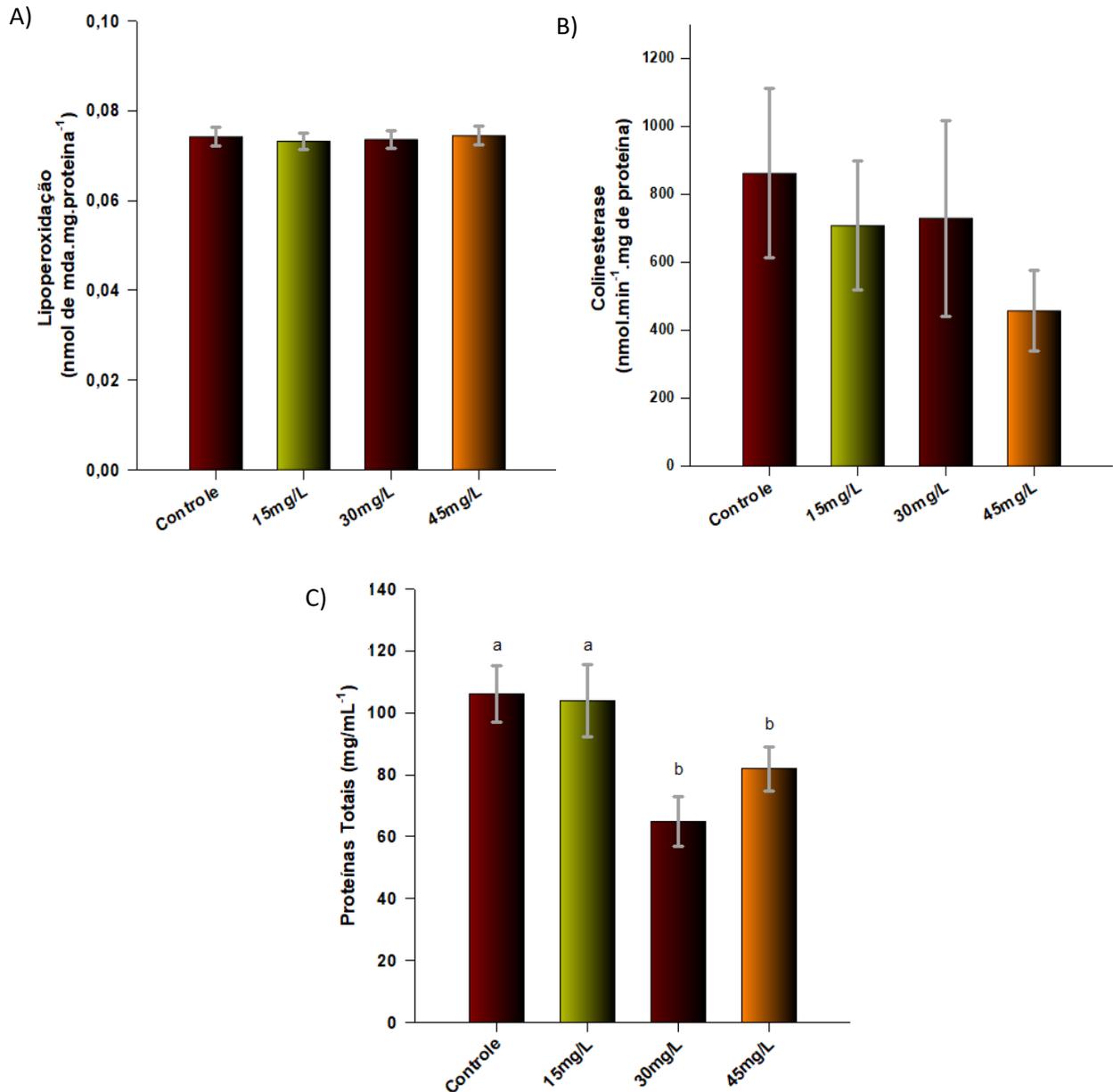


Figura 6. Médias \pm erro padrão para os juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, durante o período de 96 horas. A) Lipoperoxidação e B) Acetilcolinesterase, e C) Proteínas Totais. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. (N=8).

6. Conclusão

O efeito agudo de doses crescentes de 2,4 D indica que este agente é capaz de modificar o número de hepatócitos em *R. quelen*, um fator que pode indicar precoce vulnerabilidade hepática a efeitos tóxicos deste herbicida, com potencial efeitos deletérios a longo prazo.

O tecido muscular parece ser mais resistente aos efeitos deste agente, visto que não foi susceptível a modificações histológicas. Da mesma maneira, as análises Bioquímicas para avaliação das enzimas LPO e AChE não apresentaram alterações nas diferentes concentrações utilizadas, porém quando quantificadas as proteínas totais dos fígados, as diferenças entre os grupos foram evidenciadas, o que demonstra que o herbicida provocou danos, sugerindo uma fragilidade do órgão, em relação a dinâmica das funções bioquímicas.

Desta forma permite-se afirmar que o 2,4-D, provocou estresse agudo nos peixes submetidos as diferentes concentrações, indicando que essas alterações podem comprometer a fisiologia dos peixes e com o tempo pode evoluir para a morte dos indivíduos.

7. Referências

ALAMI-DURANTE, H., MÉDALE, F., CLUZEAUD, M., & KAUSHIK, S. **Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fish meal.** *Aquaculture*, v. 303, 50-58 p. 2010.

ASSIS, J.M.F., CARVALHO, R.F., BARBOSA, L., AGOSTINHO, C.A., & DAL PAI-SILVA, M. **Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** *Aquaculture*, 237,251-267 p. 2004.

BARCELLOS L. J. G., KREUTZ L.C., QUEVEDO R.M., FIOREZE I., CERICATO L., SOSO A. B., FAGUNDES M., CONRAD J., BALDISSERA R. K., BRUSCHI A., RITTER F. **Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement.** *Aquaculture* 232, Elsevier. 383-394 p. 2004.

BARILLET, S.; LARNOA, V.; FLORIANI, M.; DEVAUXB, A.; ADAM-GUILLERMINA, C. **Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure.** *Aquatic Toxicology* v. 100, 295–302 p. 2010.

BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem. v. 72, 248-254 p. 1976.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation.** Methods Enzymol. v. 129, 302–310 p. 1975.

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C. **Lethal Temperatures for Silver Catfish, *Rhamdia quelen*.** Fingerlings. Journal of Applied Aquaculture, v. 9, n. 4, 11–21 p. 1999.

CRESTANI M. **Efeito do herbicida clomazone sobre os parâmetros metabólicos e antioxidantes em jundiá (*Rhamdia quelen*).** Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS. 95 p.2004.

CYRINO JEP, PÓRTZ L, MARTINO RCI. **Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” *Micropterus Salmoides*.** Sci Agric, v.57, 609-616 p. 2000.

DA JANSEN, L. **Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico.** Arq. Bras. Med, v. 66, n. 2, p. 593-601 p. 2014.

DIAS, J. R. M.; DUBBERSTEIN, D.; TAVELLA, L. B.; FERREIRA, E.; STACHIW, R. **Lixiviação de 2, 4-D em solo de pastagem na amazônia ocidental.** Agro. Científica no Semi., v. 7, 15-20 p. 2011.

DIAS, J. R. M.; DUBBERSTEIN, D.; TAVELLA, L. B.; FERREIRA, E.; STACHIW, R. **Lixiviação de 2, 4-D em solo de pastagem na amazônia ocidental.** Agro. Científica no Semi., v. 7, 15-20 p. 2011.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR., V., FEATHERSTONE, R.M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** Biochem. Pharmacol. v. 7, 88–95 p. 1961.

FERREIRA JUNIOR J. A. **Caracterização anatomopatológica das lesões de filés de tilápia-do-nilo (*O. reochromis niloticus*) induzidas por *Streptococcus agalactiae* e *Francisella noatunensis orientalis***. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. 66 p. 2018.

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

FIGUEIREDO-FERNANDES, A. M., et al. **Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.3, p.103-109 p. 2007.

GOMES, L.C. et al. **Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae)**. *Ciência Rural*, v.30, n.1, 179-185 p. 2000.

GOMES, L.C., GOLOMBIESKI, J.I., GOMES, A.R.C., et al. **Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae)** - Revisão bibliográfica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.30 (1), 179-185 p. 2000.

LOMBARDI, J.V. **Fundamentos de Toxicologia Aquática**. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Ed. Varela, São Paulo. 2004.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. **Protein measurements with the Folin phenol reagent**. *J. Biol. Chem.* v.193, 265–275 p. 1951.

MALBROUCK, C.; TRAUSCH, G.; DEVOS, P.; KESTEMONT, P. **Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 135, n. 1, 39-48 p. 2003.

MASSARO, F. C. **Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidaria: Hydrozoa)**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 108 f. 2006.

MENKE, A.L.; SPITSBERGEN, J.M.; WOLTERBEEK, A.P.; WOUTERSEN, R.A. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*, v.39 (5), 759-775 p. 2011.

MENOSSE, O. C. C. **Efeito do jejum sobre o desempenho zootécnico, crescimento e degradação muscular e alterações hepáticas de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus***. Tese. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Jaboticabal – São Paulo. 68 p. 2014.

MILNE, L. S. **The histology of liver tissue regeneration**. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 13, 127-160 p. 1909.

MIRANDA, A.L.C. **Bioacumulação de poluentes organopersistentes (POPs) em traíra (*Hoplias malabaricus*) e seus efeitos in vitro em células do sistema imune de carpa**. Dissertação (Mestre em Biologia celular e molecular) – UFPR, Curitiba, 166 p. 2006.

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

MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A., BAINY, A.C.D. **Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species**. *Mar. Environ. Res.* v. 54, 781–785 p. 2002.

MONSERRAT, J.M. **Pollution Biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives**. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146, 221- 234 p, 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, R.S. **Efeito de sub-doses de 2,4-D na produtividade de uva Itália e susceptibilidade da cultura em função de seu estágio de desenvolvimento**. *Engenharia Agrícola*, Maringá, v. 27, 35 – 40 p. 2007.

OLIVEIRA R. H. F. et. al., **O extrato de maracujá sobre a morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.12, 2562-2567 p. dez, 2010.

OLIVEIRA V. P., **Estudo histopatológico em juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a ensaio toxicológico com ibuprofeno.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo - PR. 33 p. 2017.

PAULINO, M. G.; TAVARES, D.; TEREZAN, A. P.; SAKURAGUI, M. M.; PESENTI, E.; GIANI, A.; FERNANDES, M. N. **Biotransformations, antioxidant system responses and histopathological indexes in the liver of fish exposed to cyanobacterial extract.** Environ. Toxicol. and Chem., v. 39, n. 5, 1041-1051 p. 2020.

PRETTO A., **Parâmetros toxicológicos em jundiás *Rhamdia quelen* expostos ao Cádmiio.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria- RS, 117 p. 2008.

ROBERTS, R. J.; RODGER, H. D. **The pathophysiology and systematic pathology of teleosts.** In: ROBERTS, R. J. Fish pathology. Wiley-blackwell 4. ed., 581 p. 2012.

ROCHA R. M. et al. **Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (castelnau, 1855) da baía do guajará, Belém, Pará.** Ci. Anim. Bras., Goiânia, v. 11, n. 1, 101-109 p. jan./mar. 2010.

ROCHA, R. M., COELHO, R. P., MONTES, C. S., SANTOS, S. S. D., & FERREIRA, M. A. P. **Avaliação histopatológica do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) da Baía do Guajará, Belém, Pará.** Ciência Animal Brasileira, v. 11 (1), 101-109 p. 2010.

RODRIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto MogiGuaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae).** Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 138 f. 2007.

ROTILI D. A. et. al. **Uso de eugenol como anestésico em pacu.** - Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, v. 42, n. 3, 288-294 p. jul./set. 2012

SALVO, L.M. et. al. **Effects of endosulfan sublethal concentrations: on carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758): morphometric hystologic, ultrastructural analyses and**

cholinesterase activity evaluation. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. v.45, 87-94 p. 2008.

SAMPAIO, L.R., SILVA, M.C.M., OLIVEIRA, A.N., and SOUZA, C.L.S. **Avaliação bioquímica do estado nutricional.** In: SAMPAIO, L.R., org. Avaliação nutricional. Salvador: EDUFBA, 49-72 p. 2012.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. **Estresse oxidativo e envelhecimento: Papel do exercício físico.** Motriz, v. 16, n. 2, 506- 515 p. 2010.

SÄNGER, A. M. AND STOIBER, W. **Muscle fiber diversity and plasticity.** In **Muscle development and growth 1463.** San Diego: Academic Press. (ed. Johnston, I. A.), 187–250 p. 2001.

SANTOS, C. H. DOS A. DOS ET AL. **Crescimento de tilápia-do-nylo alimentada com peixes marinhos provenientes da pesca do camarão.** Ciência Animal Brasileira, v. 8, n. 2, 185-192 p. abr./jun. 2007.

SANTOS, E. A.; CORREIA, N. M.; BOTELHO, R. G. **Resíduos de herbicidas em corpos hídricos - Uma revisão.** Rev. Bras. de Herb., Londrina, v. 12, n. 2, p. 188-201 p. 2013.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. **Glutathione-dependet protection against oxidative injury.** Pharmacol Ther. v. 47, 61–71 p. 1990.

SHAW, D.R.; ARNOLD, J.C. **Weed control from herbicide combinations with glyphosate.** Weed Technology, Lawrence, v. 16 (1), 1 – 6 p. 2002.

SILVA, D. C. **Variações em biomarcadores bioquímicos de contaminação em Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de diferentes portes.** Dissertação de Mestrado, São José do Rio Preto, 64 p. 2012.

SILVA, M. J. S. **Efeito agudo da amônia e do nitrito em tilápias *Oreochromis niloticus* mantidas em baixa salinidade.** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. 48 p. 2013.

SONG, Y. **Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide.** *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 56, 106–113 p. 2014.

TEIXEIRA, V. O. N.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. **Mecanismos de perda muscular da sarcopenia.** *Rev. Bras. Reumatol.* v.52, p. 252-259. 2012.

WANG, O. et al. **Acetylation of Metabolic Enzymes Coordinates Carbon Source Utilization and Metabolic Flux.** *Science*, v. 327, 1004-1007 p. 2010.

WOOTTON, R. J.; EVANS, G. W.; MILLS, L. A. **Annual cycle in female three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.) from an upland and lowland population.** *Journal of Fish Biology*, v. 12, 331-343 p. 1978.

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

Avaliação hematológica em juvenis de *Rhamdia quelen* expostos ao efeito agudo do herbicida 2,4 diclorofenoxiacético

Vanilva Pereira de Oliveira¹; Gilmar Baumgartner¹ e Sabrina Grassioli^{2,3} e Mariana Lins Rodrigues⁴

^{1,4}Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus Toledo, Rua da Faculdade, 645 - Jardim La Salle, CEP 85903-000. Toledo – PR, Brasil.

²Universidade Estadual do Oeste do Paraná, PPG-Biociências e Saúde; ua. Universitária, 1619 – Jardim Universitário, CEP 85819-110. Cascavel - PR – Brasil.

³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, PPG-Ciências Aplicadas a Saúde – Campus Francisco Beltrão, PR, Brasil.

RESUMO

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do planeta em volume de produtos, o que tem gerado grandes preocupações ambientais. Em contato com a água esses agroquímicos podem provocar graves danos à biota aquática. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de toxicidade aguda do herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre parâmetros hematológicos, em juvenis de *Rhamdia quelen* (siluriforme). Para tal, exemplares (n=96) de *R. quelen* foram expostos a concentrações crescentes do herbicida 2,4-D (0,0; 15; 30 e 45 mg/L) por 96h, sendo testadas 4 réplicas, com 6 exemplares cada. Após anestesia foram realizadas coletas de sangue, para quantificação dos eritrócitos leucócitos, monócitos e trombócitos. Os resultados confirmam que o valor médio de eritrócitos da espécie é $1,5 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, como registrado na literatura. Adicionalmente foi encontrada uma redução significativa no número de eritrócitos, leucócitos, monócitos e trombócitos frente a exposição a elevadas das concentrações de 2,4-D, indicando forte efeito agudo sobre aspectos hematológicos da espécie. A redução da linhagem sanguínea branca e vermelha provocadas precocemente pela exposição ao 2,4-D em *R. quelen* mostra rápido efeito deletério hematológico nesta espécie, o que provoca baixa oxigenação tecidual e causa vulnerabilidade imunológica.

Palavras-chave: Hematologia, esfregaço, herbicida, siluriforme.

ABSTRACT

Brazil is the largest consumer of pesticides on the planet in terms of product volume, which has generated great environmental concerns. In contact with water, these agrochemicals can cause serious damage to aquatic biota. The objective of the present study was to evaluate the effect of acute toxicity of the herbicide 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on hematological parameters, in juveniles of *Rhamdia quelen*. For this, specimens (n = 96) of *R. quelen* were exposed to increasing concentrations of the herbicide 2,4-D (0,0; 15; 30 and 45 mg/L) for 96h, being tested 4 replicates, with 6 specimens each. After anesthesia, blood samples were taken, the number of erythrocytes in the Neubauer chamber and blood smears were made, in which blood cells were identified after staining with panotic dye. The total erythrocyte count and leukocyte and thrombocyte differential were evaluated on the slides. Here we confirm that the average erythrocyte value of the species is $1.6 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$. Additionally, a significant reduction in the number of erythrocytes, leukocytes, monocytes and thrombocytes was found in view of the high exposure of 2,4-D concentrations, indicating a strong acute effect on hematological aspects of the species. The reduction in the white and red bloodline caused early by exposure to 2,4-D in *R. quelen* shows a rapid hematological deleterious effect in this species, which causes low tissue oxygenation and causes immunological vulnerability.

Keywords: hematology, smear, herbicide, siluriform

8. Introdução

Devido a eficácia e o custo benefício que apresenta, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético tem sido utilizado em larga escala, e tem levantado preocupações quanto aos aspectos ambientais, pois a degradação de suas moléculas pode perdurar por muito tempo no ambiente (DIAS et al., 2011). Este herbicida apresenta persistência de curto a médio prazo nos solos, podendo provocar intoxicação em espécies sensíveis (SILVA et al. 2007). Os compostos químicos, que desempenham um papel de mimetizadores de auxinas naturais, são amplamente comercializados, pois atuam como hormônios importantes para o desenvolvimento e crescimento das plantas. Quando utilizados em quantidades alteradas, pode causar danos as plantas e ao meio ambiente (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2014), principalmente no meio aquático, já que estas concentrações elevadas podem ser lixiviadas.

O 2,4-D pode apresentar riscos após sua aplicação, ocasionando danos ambientais, principalmente devido à contaminação do solo e de águas subterrâneas, além de ocasionar problemas em áreas próximas com cultivo de culturas sensíveis a esse produto (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2007; FU et al., 2009). Estes contaminantes quando atingem a água, podem ser monitorados por meio de biomarcadores, que são ferramentas que permitem a obtenção de respostas adaptativas para os vários parâmetros biológicos em respostas aos contaminantes ambientais (PAULINO et al., 2012).

Os eritrócitos de peixes são comumente utilizados como biomarcadores para avaliação dos testes toxicológicos, essas células por serem nucleadas permitem verificar qualquer lesão associada ao herbicida (MORON et al., 2006). Similarmente, a contagem diferencial de leucócitos circulantes no sangue, está entre os parâmetros hematológicos mais utilizados para análises de saúde animal, visto que estas células possuem importantes ações imunológicas e auxiliam na descrição das exigências homeostáticas (RORIZ et al., 2015).

A espécie escolhida para este estudo é o *Rhamdia quelen* (jundiá), um siluriforme de hábito onívoro, encontrado desde o sul do México até a Argentina (LAZZARI et al., 2006). Também conhecido como bagre do sul americano (TAVARES-DIAS et al., 2002), esse teleósteo tem sido muito utilizado em ensaios ecotoxicológicos.

Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar, possíveis alterações hematológicas por ação do agente herbicida 2,4-D e diagnosticar a sua toxicidade para os

juvenis de *R. quelen*, pois pouco se conhece sobre a influência do estresse por exposição ao 2,4-D na fisiologia da espécie.

9. Materiais e Métodos

9.1. Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual Oeste do Paraná – UNIOESTE/Campus Toledo.

9.2. Peixes

Os exemplares de Jundiá (*Rhamdia quelen*) foram adquiridos em uma piscicultura comercial da região, sendo que foram utilizados 96 indivíduos com peso médio de 17 ± 2 g, e por um período de 96 horas, estes peixes foram ambientados e alimentados uma vez por dia com ração comercial (40% proteína). Durante este período eles ficaram em observação a fim de monitorar as possíveis variações (estresse, parasitismo e mortalidade) que pudessem interferir negativamente no experimento. Foram monitorados também os valores de temperatura, pH e oxigênio, os quais se mantiveram dentro da normalidade, para o cultivo desta espécie.

9.3. Desenho Experimental

Após o período de ambientação, os peixes foram transferidos para 16 aquários com um volume total de 15 litros de água cada, a uma densidade de 6 peixes por aquário e sistema de aeração individual. Durante o experimento os peixes foram alimentados uma vez ao dia e a água utilizada para o ensaio se manteve com um pH entre 7,1 e 7,9.

A exposição ao 2,4-D ocorreu por via hídrica, por um período de 96 horas, sendo que houve troca da água e reposição das concentrações ao completar 48 horas de experimento. As concentrações do herbicida utilizadas foram: 15 mg/L; 30 mg/L e 45 mg/L (sendo esta última a concentração já utilizada em estudos com mamíferos) e 0,00 mg/L (grupo controle). Após o término do experimento, os animais foram anestesiados com benzocaína (0,001%), para realização da biometria (medição e pesagem) com auxílio de ictiômetro e balança digital. O sangue foi coletado através de punção da veia caudal, para contagem do número de eritrócitos e confecção de esfregaços sanguíneos, e imediatamente os peixes foram eutanasiados.

9.4. Análises Hematológicas

Para as análises sanguíneas, foram selecionados aleatoriamente, dois peixes por aquário, que foram anestesiados com benzocaína e o sangue coletado por punção caudal, com seringas descartáveis de 1,0mL e agulha de 0,45x13mm contendo EDTA a 5%. Após a coleta foram confeccionados os esfregaços sanguíneos, sendo produzidas duas lâminas para cada peixe, em seguida foi realizada a diluição de uma porção de sangue, em solução de líquido de Hayem (1:200), para contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer. Os esfregaços sanguíneos, foram corados, pelo método panótico rápido, metodologia estabelecida por Romanowsky (Keebler & Somrak, 1993), e utilizados para contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos) e trombócitos, sendo os resultados expressos em número por μL . Para os cálculos utilizou-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Leucócitos} \left(\frac{n}{\mu\text{L}} \right) = \frac{n. \text{Trombócitos} \times n. \text{Eritrócitos}}{2000 \text{ eritrócitos}}$$

$$\text{Trombócitos} \left(\frac{n}{\mu\text{L}} \right) = \frac{n. \text{Leucócitos} \times n. \text{Eritrócitos}}{2000 \text{ eritrócitos}}$$

9.5. Análises Estatísticas

Para todos os parâmetros analisados, foram realizadas análises não paramétricas (Kruskall-Wallis), seguidas de Teste de Dunn's, para comparação das medianas entre os grupos experimentais. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. Os dados foram avaliados por meio do programa estatístico Sigma Plot 12.0.

10. Resultados e Discussão

Ao longo do experimento, os parâmetros físico-químicos da água se mantiveram praticamente constantes e dentro das condições ótimas para a espécie, independente do grau de concentração do 2,4 D. Em relação a temperatura o *Rhamdia quelen*, possui capacidade térmica de suportar variações entre 15 a 34°C, por isso é considerado como uma espécie euritérmica (CHIPPARI-GOMES & GOMES, 1999). Ao final do bioensaio os grupos controle e 15mg/L apresentaram TS de 100%. Entretanto, nas concentrações de 30mg/L e 45mg/L do herbicida, a

TS foi reduzida para 95,83%. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,588$).

As células sanguíneas quantificadas para este estudo foram: eritrócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e trombócitos. Eritrócitos (Figura 7A), com forma predominante elíptica, com o núcleo também elíptico localizado centralmente; Leucócitos (Figura 7B), são células grandes que apresentam grande núcleo circular; Linfócitos (Figura 7C), células arredondadas, apresentando tamanho pequeno e projeções citoplasmáticas; Neutrófilos (Figura 7D) são células arredondadas, com núcleo irregular; Monócitos (Figura E) são células maiores que os linfócitos, com citoplasma grande, o núcleo é variado e Trombócitos (Figura 7F), são células que variam de elíptico-alongado até ameboide (TAVARES-DIAS et. al., 2002; SILVA 2012;). Neste estudo as células de defesa orgânica mais frequente nas extensões sanguíneas foram os leucócitos e linfócitos.

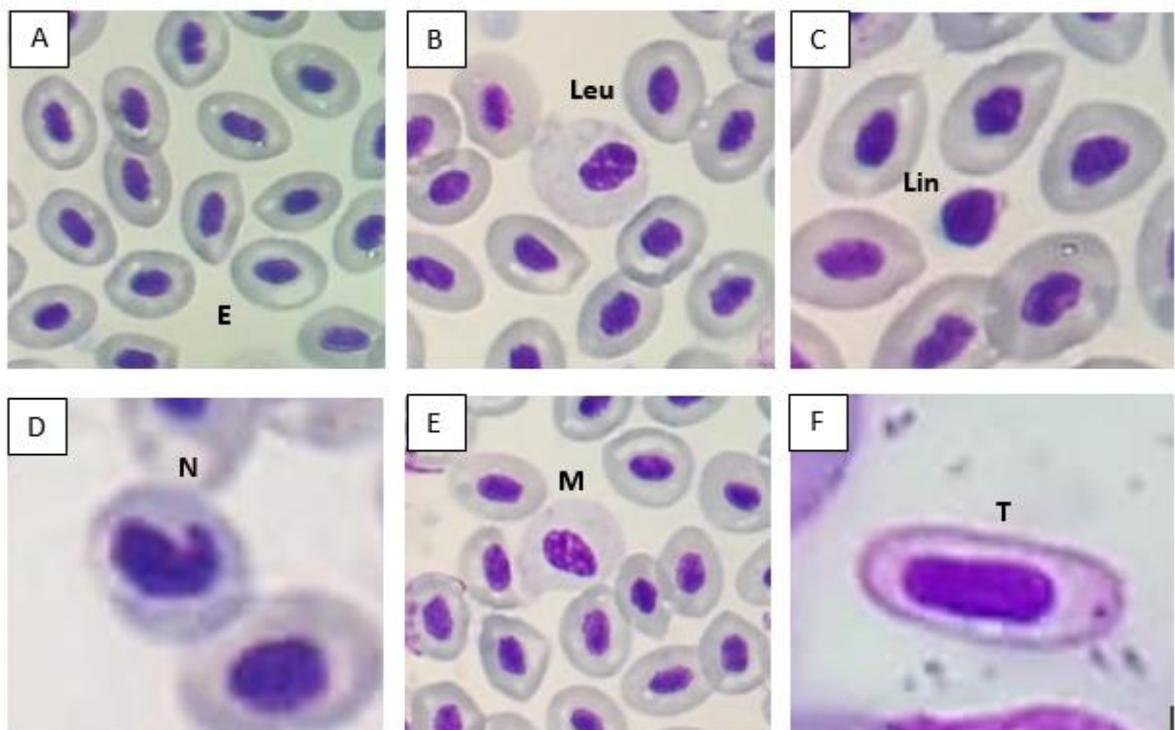


Figura 7. Fotomicrografia das células sanguíneas de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes concentrações do 2,4-D. A) Eritrócitos, B) Leucócitos, C) Linfócitos, D) Neutrófilos, E) Monócitos e F) Trombocitos. Panótico, Objetiva de 100x.

Tabela 2: Valores dos parâmetros sanguíneos, em 1° e 2° quartil, mediana, mínimo e máximo, obtidos nos diferentes tratamentos com 2,4-D, aplicados aos juvenis de *Rhamdia quelen*.

Grupos		Linfócitos (μL^{-1})	Monócitos (μL^{-1})	Neutrófilos (μL^{-1})	Leucócitos (μL^{-1})	Trombócitos (μL^{-1})	Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)
Controle	1° e 2°	108629	0	0	112466	4427	280961
	quartil	187609	1086	1131	188379	12225	309591
	Mediana	125670	0	518	126293	6116	293548
	Mínimo	32047	0	0	33210	680	162000
	e Máximo	225063	2251	7408	225064	17442	345000
15mg/L	1° e 2°	67192	0	494	69600	2514	171633
	quartil	116347	830	2551	121758	8462	178937
	Mediana	91508	531	1844	93376	4995	174183
	Mínimo	43800	0	0	46105	1221	157000
	e Máximo	145140	4026	5882	137655	10174	236000
30mg/L	1° e 2°	40125	0	562	42003	1127	164732
	quartil	90770	1232	2386	94862	5190	170000
	Mediana	62199	0	1346	65303	2580	166038
	Mínimo	0	0	0	0	0	139000
	e Máximo	133525	3441	3950	137655	11425	215000
45mg/L	1° e 2°	9480	0	99	9786	271	322279
	quartil	15133	38	731	15879	778	330159
	Mediana	14212	0	273	14761	667	324144
	Mínimo	0	0	0	0	0	228000
	e Máximo	30970	393	1290	32260	3145	416000

O número médios dos eritrócitos (Figura 8A) totais foi $1,5 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, cujo valor é semelhante ao encontrado para *Rhamdia quelen* (que foi de $1,5 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), por Kavamoto et. al., (1983). Nestes estudos, os valores médios encontrados para leucócitos e linfócitos foi de $0,7 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, já para os monócitos, neutrófilos e trombocitos os valores médios foram inferiores a 0 (Tabela 2). Quando comparados os grupos experimentais, percebe-se que houve diferença significativa na concentração de eritrócitos, sendo que o controle apresentou a maior concentração média. A queda no número de eritrócitos registrada na presença do 2,4-D, indica um declínio na oxigenação do indivíduo, tendo em vista que o estresse, provoca hipóxia, e consequentemente alterações morfológicas, como diminuição no desenvolvimento e crescimento, mudanças no comportamento fisiológico e metabólico em diversas etapas do ciclo de vida do peixe (MELO, 2008). A redução na concentração dos eritrócitos, como observada pode levar a anemia, como sugerido pelo estudo de Seriani et. al. (2014). A anemia em peixes foi observada para *O. niloticus* expostos a concentração subletal de Quinclorac, um herbicida mimetizado de auxina (FATHY et al., 2019). A anemia em peixes expostos a herbicidas

provoca destruição dos eritrócitos, disfunção osmorregulatória e a insuficiência na atividade hematopoiética do rim e do baço (MIKULA et al., 2008).

Em relação ao número de leucócitos (Figura 8B), observou-se uma queda nos grupos submetidos ao 2,4-D, quando comparado ao grupo controle (não expostos), com diferença significativa. Resultados semelhantes foram registrados em carpa (*C. carpi*), submetida a concentração de 19,48 mg L⁻¹ de diazinon (organofosforado) por um período de 96 horas, caracterizando o processo de leucopenia (SVOBODA et al., 2001). Em estudos realizados por Vosylienė (1999), foi observado que a exposição contínua ao fator de estresse, causou um decréscimo no número de leucócitos, debilitando o sistema imune. A variação no número de leucócitos, indica um processo inflamatório e/ou infeccioso em teleósteos (YUNISAGUINAGA et al., 2016; CLAUDIANO et al., 2019).

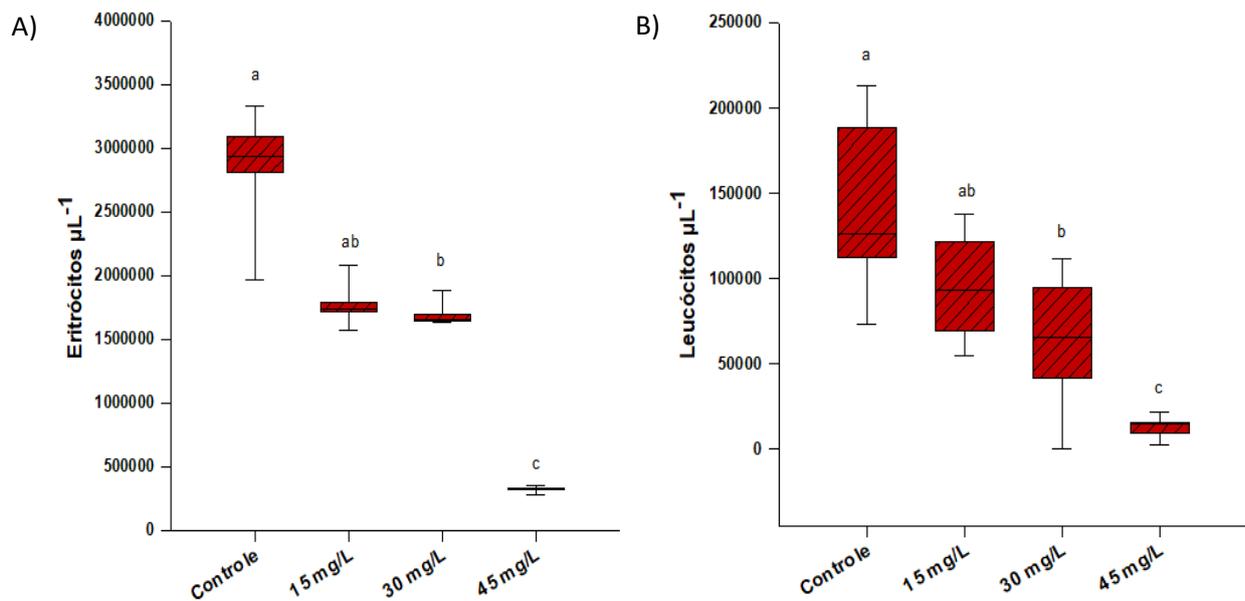


Figura 8. Resultado da Análise não paramétrica para Eritrócitos (A) e Leucócitos (B) expressos em mediana, 1° e 2° quartil e mínimo e máximo), para juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos a ensaio toxicológico com o 2,4 -D. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes, com um nível de confiança de $p \leq 0,05$ (N=8).

De acordo com Barton & Iwama (1991) a queda no número de linfócitos indica uma situação de pós estresse. Uma diminuição significativa nas concentrações de linfócitos foi verificada neste trabalho, em todas as concentrações crescentes do 2,4-D, sendo mais expressiva na de 45mg/L (Figura 9A). Essa queda, ocorre pela redistribuição dos linfócitos circulantes (MAZEAUD et al. 1977, RIJNBERK & MOL, 1997). Os linfócitos atuam no processo de

defesa do organismo, sobretudo em situações de estresse, onde o número de células circulantes diminui. Para os peixes os linfócitos estão associados ao processo inflamatório, na resposta humoral e também mediada por células frente a diversas situações (IWAMA & NAKANISHI, 1996).

Os neutrófilos, são células que atuam diretamente no processo inflamatório, e também realizam a atividade de fagocitose na maior parte das espécies (AINSWORTH, 1992). Para este trabalho, se mantiveram elevados nas concentrações de 15mg/L e 30mg/L, já na concentração de 45mg/L houve uma redução (Figura 9B), ficando significativamente igual ao grupo controle, ou seja, mesmo na presença do agente estressor, as células reestabeleceram a sua produção normal. O aumento no número de neutrófilos, indica o processo de neutrofilia, em decorrência da sua migração para o compartimento tecidual (diapedese), o que aumenta seu tempo na circulação. Por outro lado, a redução no número de neutrófilos circulantes pode sugerir aumento do recrutamento desse grupo celular para tecidos que apresentam lesão focal (HAVIXBECK E BARREDA, 2015), o que parece ter ocorrido na concentração de 45 mg/L.

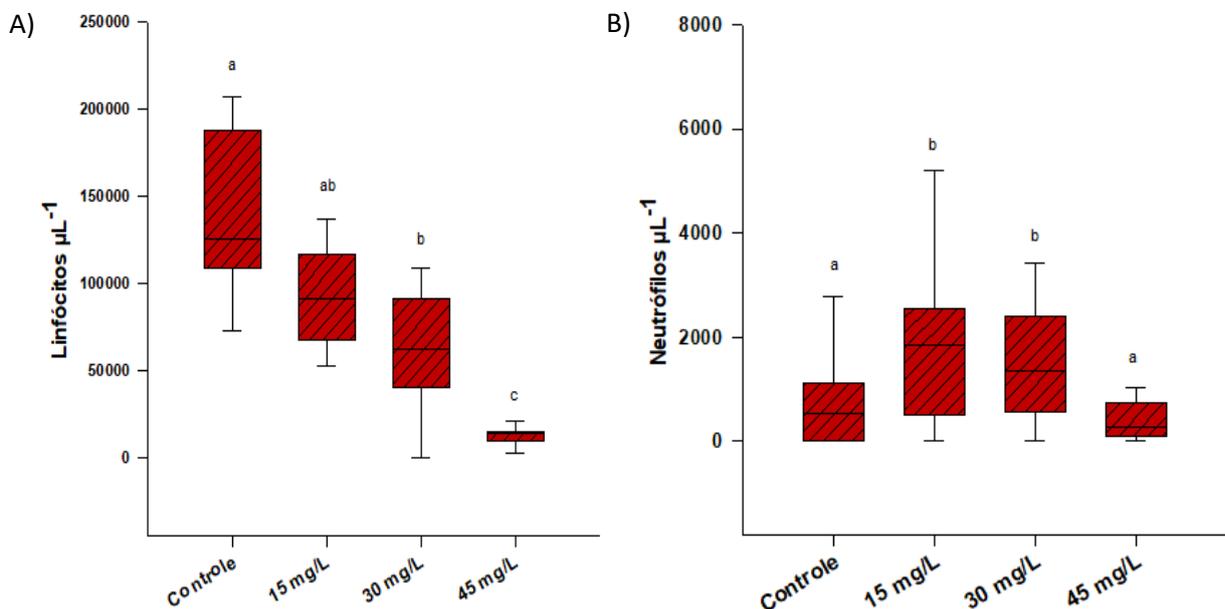


Figura 9. Resultados da Análise não paramétrica para Linfócitos (A) e Neutrófilos (B), expressos em mediana, 1° e 2° quartil, mínimo e máximo, para *Rhamdia quelen*, submetidos a ensaio toxicológico com o 2,4 -D. Letras diferentes, indicam valores significativamente diferentes, com um nível de confiança de $p \leq 0,05$. (N=8).

Os monócitos também são conhecidos como macrófagos circulantes (HRUBEC & SMITH 2010) e nos peixes desempenham o papel de primeira célula fagocítica (ELLIS, 1977),

o que justifica as respostas obtidas neste trabalho, onde houve declínio na concentração mais elevada, o que aponta para a perda na capacidade de defesa do organismo (Figura 10A). Neste estudo o número destas células se mantiveram homogêneas para o grupo controle e concentrações de (15; 30mg/L), porém para a concentração mais elevada (45mg/L) houve um declínio significativo dessas células, deixando os peixes com baixa capacidade de reação/defesa ao herbicida.

Apesar de serem células pouco estudadas, nos peixes sabe-se que os trombócitos (Figura 10B), além de sua influência na coagulação do sangue, podem estar relacionados com o sistema de defesa envolvido em processo inflamatório e atividade fagocitária, como relatado por Matushima & Mariano (1996). Os trombócitos atuam com função de defesa, apesar de não serem classificados como leucócitos, desenvolvem uma função parecida, atuando na defesa em peixes (GRECCHI et al. 1980; KAJIGA YA et al. 1985; MATUSHIMA & MARIANO 1996). Neste trabalho, houve uma diminuição significativa no número de trombócitos, para as concentrações mais elevadas, sugerindo uma resposta baixa de defesa do organismo frente a exposição ao herbicida 2,4-D (Figura 8B), o que deixa o organismo vulnerável e indica um desequilíbrio hemostático (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; TAVARES-DIAS; OLIVEIRA, 2009).

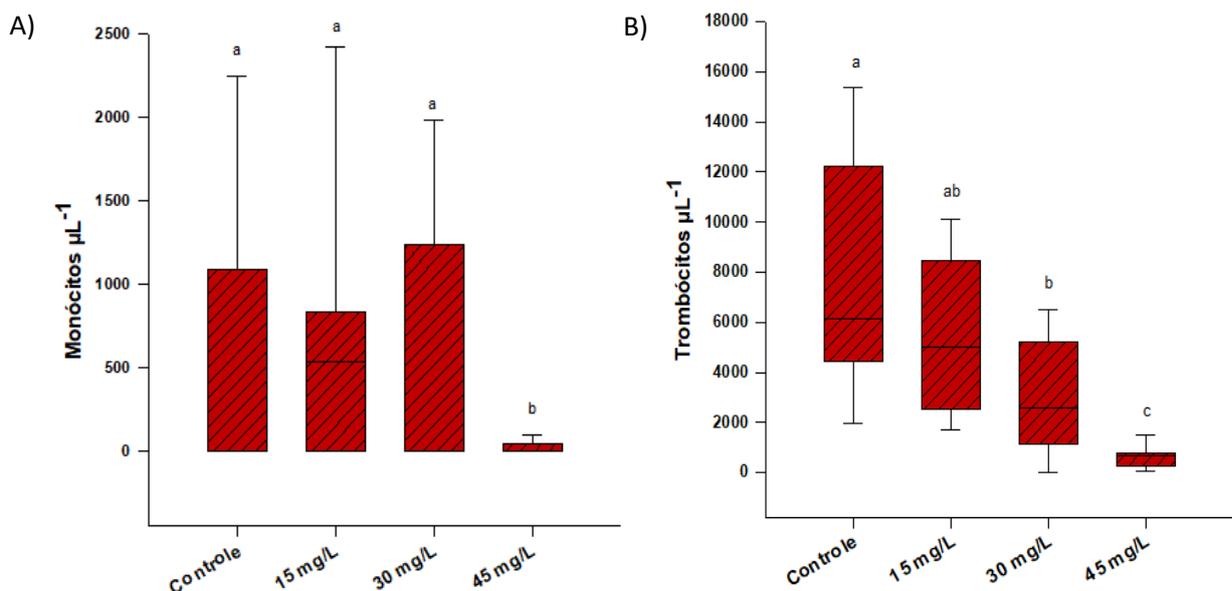


Figura 10. Resultado da Análise não paramétrica para Monócitos (A) e Trombócitos (B), expressos em mediana, 1º e 2º quartil, mínimo e máximo, para *Rhamdia quelen*, submetidos a ensaio toxicológico com o 2,4 -D. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes, com um nível de confiança de $p \leq 0,05$. (N=8).

11. Conclusão

A análise hematológica indica que agudamente o 2,4 D é capaz de reduzir, em especial o número de células da linhagem vermelha e branca no sangue de *R. quelen*, sendo uma forte evidência do efeito anêmico que causa menor disponibilidade de oxigênio aos tecidos e estresse celular. Finalmente, a queda da linhagem branca, indica profundo efeito supressor imunológico que eleva a susceptibilidade da espécie estudada a infecções e eventos patológicos.

12. Referências

- AINSWORTH, A.J. **Fish granulocytes: morphology, distribution, and function.** *Annu. Rev. Fish Dis.*, v. 2, 123 – 48 p. 1992.
- BARTON, B.A. & IWAMA, G.K. **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.** *Annual Reviews on Fish Diseases*, Vancouver, v.10, 3-26 p. 1991.
- CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C. **Lethal Temperatures for Silver Catfish, *Rhamdia quelen*.** *Fingerlings. Journal of Applied Aquaculture*, v. 9, n. 4, 11–21 p. 1999.
- DIAS, J. R. M.; DUBBERSTEIN, D.; TAVELLA, L. B.; FERREIRA, E.; STACIWI, R. **Lixiviação de 2, 4-D em solo de pastagem na amazônia ocidental.** *Agro. Científica no Semi.*, v. 7, 15-20 p., 2011.
- ELLIS, A. E. **The leucocytes of fish: a review.** *Journal. Fish Biology.*, v. 11, 453- 491 p. 1977.
- FATHY, M., MOHAMED, I. A., FARGHAL, A. I. A., TEMERAK, S. A. H., SAYED, A. E.D. **H. Hemotoxic effects of some herbicides on juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*.** *Environ. Sci. and Pollution Research*, v. 26, 30857- 30865 p. 2019.
- GRECCHI, R.; A.M. SALIBA & M. MARIANO. **Morphological changes, surface receptors and phagocytic potencial of fowl mononuclear phagocytes and trombocytes in vivo and in vitro.** *Jour. Pathol*, v.130, 23-31 p. 1980.

Havixbeck, J.J., Barreda, D.R. **Neutrophil development, migration, and function in teleost fish**, *Biology*. 4, 715-734 p. 2015.

HIGUCHI L. H., et.al. **Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos à dieta com diferentes níveis proteicos e energéticos**. *Ci. Anim. Bras.*, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 70-75, jan./mar. 2011.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. **Hematology of fishes**. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Ames: Blackwell Publishing, Cap. 126, 994-1004 p. 2010.

IWAMA G. & NAKANISHI T. **The Fish Immune System**. Academic Press, London. 380 p. 1996.

KAJIGAYA, H.; M. KAMEKURA; N. TANAHARA; A. OTHA; H. SUZUKI; M. SUGIYAMA & M. ISOSA. **Acute and chronic inflammation induced by silk sutures in chicken mesentery**. *Bull. Nippon Veto Zoot. Col.* v.34, 35-8 p. 1985.

KAVAMOTO, E.T., RANZANI-PAIVA, M.J., TOKUMARU, M. **Estudos hematológicos em "bagre" *Rhamdia hilarri* (Val.1840) teleósteos, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro**. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v.10, n. único, 53-60 p. 1983.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; EMANUELLI, T.; PEDRON, F. A.; COSTA, M. L.; LOSEKANN, M. E.; CORRÊIA, V.; BOCHI, V. C. **Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*)**. *Ciência Rural*, v. 36, n. 1, 240-246 p. 2006.

MATUSHIMA E.R. & MARIANO M. **Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia)**. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.33, 5-10 p. 1996.

MAZEAUD M.M., MAZEAUD F. & DONALDSON E.M. **Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review**. *T. Am. Fish. Soc.* v.106, 201-212 p. 1977.

MELO, D.C. **Indicadores hematológicos e imunológicos após estresse crônico por hipóxia em tilápia (*Oreochromis niloticus*), linhagem chitralada.** Tese (Doutorado) - Escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 38 p., 2008.

MIKULA, P., MODRA, H., NEMETHOVA, D., GROCH, L., SVOBODOVA, Z. **Effects of subchronic exposure to LASSO MTX (alachlor 42% W/V) on hematological indices and histology of the common carp, *Cyprinus carpio* L.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. v. 81, 475–479 p. 2008.

MORON, S. E.; POLEZ, V. L. P.; ARTONI, R. F.; RIBAS, J. L.; TAKAHASHI, C. H. K. **Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 1, n.1, 27–30 p., 2006.

OLIVEIRA JUNIOR, R.S.; CONSTANTINI, J.; FILHO, B.; CALLEGARI, O.; PAGLIARI, P. H.; CAVALIERI, S. D. **Efeito de sub-doses de 2,4-D na produtividade de uva Itália e susceptibilidade da cultura em função de seu estágio de desenvolvimento.** Engenharia Agrícola, Maringá, v. 27, 35 – 40 p. 2007.

PAULINO, M.G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. **Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical fresh water fish, *Prochilodus lineatus*.** Ecotoxicol Environ Saf. v. 80, 6–13 p. 2012.

RIJNBERK A. & MOL J.A. **Adrenocortical function.** In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds), Clinical Biochemistry of Domestic Animal. 5th ed. Academic Press, San Diego. 533 – 568 p. 1997.

RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; PAZMIÑO, D. M.; SPARKES, I.; ROCHETTI, A.; HAWES, C.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; SANDALIO, L. M. 2,4- 37 **Dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics.** J. of Exper. Botany, v. 65, 4783–4793 p. 2014.

RORIZ, B. C.; MARIANO, W. S.; TAKAKO, A. K.; CASTRO, F. J.; GARCIA, R. G. **Efeitos do estresse de exposição ao ar sobre parâmetros sanguíneos de juvenis de caranha, *Piaractus brachypomus***. Enciclo. Bio., v.11, n. 21; 2231 p. 2015.

SANTOS, C. H. DOS A. DOS ET AL. **Crescimento de tilápia-do-nilo alimentada com peixes marinhos provenientes da pesca do camarão**. Ciência Animal Brasileira, v. 8, n. 2,185-192 p. abr./jun. 2007.

SARAVANAN, M., KIM, J.Y., HUR, K.J., RAMESH, M., HUR, J.R. **Responses of the freshwater fish *Cyprinus carpio* to different concentrations of butachlor and oxadiazon**. Biocatal Agric Biotech. v. 11, 275–281 p. 2017.

SERIANI, R. & RANZANI-PAIVA, M.J.T. **Alterações hematológicas em peixes: Aspectos fisiopatológicos e aplicações em ecotoxicologia aquática** In: SILVA-SOUZA, A.T.; PEREZ LIZAMA, M. A.; TAKEMTO, R.M. (Org). Patologia e sanidade de organismos aquáticos. Maringá: ABRAPOA. 221-242 p. 2012.

SILVA A. A., VIVIAN R & OLIVEIRA JÚNIOR RS. **Herbicidas: Comportamento no solo**. In: Silva AA & Silva JF (Eds). Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa, Editora UFV. 156-209 p. 2007.

SILVA A. S. E. **Perfil hematológico do peixe beijupirá, *Rachycentron canadum* (linnaeus, 1766), cultivado em diferentes salinidades**. Universidade Federal Rural do Semi-árido Mossoró/RN – Brasil. 38 p. Agosto/2012.

SVOBODA, M.; LUSKOVA, J.; DRASTICHOVA, V.; ZLABEK, V. **The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.)**. Acta Vet. Brno. v.70, 457-465 p. 2001.

TAVARES-DIAS M. et. al. **Características hematológicas de teleósteos brasileiros. iv. variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (pimelodidae)**. Ciência Rural, Santa Maria, v.32, n.4, 693-698 p. 2002.

TAVARES-DIAS, M. & MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress. 144 p. 2004.

TAVARES-DIAS, M. & OLIVEIRA, S.R. **A review of the coagulation system of fish**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v.7, 205-224 p. 2009.

VOSYLIENÉ, M.Z., **The effects of heavy metals on haematological indices of fish (Survey)**. Acta Zoologica Lituanica. v. 9, 76-82 p. 1999.

YUNIS-AGUINAGA J., FERNANDES D.C., ETO S.F., CLAUDIANO G.S., MARCUSO P.F., MARINHO-NETO F.A., FERNANDES J.B.K., MORAES F.R. & MORAES J.R.E. **Dietary camu camu, Myrciaria dubia, enhances immunological response in Nile tilapia**. Fish & shellfish immunology. v. 58, p. 284-291 p. 2016.