

**Universidade Federal do Tocantins**

**Toxicidade aguda e subaguda do triclorfon em juvenis de tambaqui  
(*Colossoma macropomum* CUVIER, 1836)**

**Alysson Soares da Rocha**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins.

Área de concentração: Produção Animal

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Gomes Marçal Vieira Vaz

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Estevan Moron

Araguaína

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Toxicidade aguda e subaguda do triclorfon em juvenis de tambaqui  
(*Colossoma macropomum* CUVIER, 1836)**

Por

Alysson Soares da Rocha

Dissertação aprovada como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre, tendo sido julgada pela  
Banca Examinadora formada pelos professores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Gomes Marçal Vieira Vaz

---

Prof. Dr. Sandro Estevan Moron

---

Prof. Dr. Fábio de Jesus Castro

Araguaína, 24 de março de 2009

*Dedico este trabalho à minha linda filha  
Beatriz que com seu sorriso foi a fonte de toda  
minha inspiração e à minha amada esposa  
Suzana que foi a minha fortaleza. Dedico  
também a meu saudoso e querido pai, Carlos e  
minha dedicada mãe, Rosália que me deram  
tudo.*

## Agradecimentos

A DEUS, fonte de inspiração e sabedoria...

Aos meus pais, avós e familiares em geral, que me deram o suporte e o incentivo necessários para que eu pudesse prosseguir com tranquilidade e, apesar da distância, sempre estiveram presentes apoiando-me irrestritamente na elaboração desta dissertação.

Ao Prof. Sandro Estevan Moron, pela orientação, amizade e que em nenhum momento me deu o peixe e sim me ensinou a pescar.

À Prof<sup>ª</sup>. Jeane, pelos ensinamentos, orientação e amizade;

À Prof<sup>ª</sup>. Roberta pela orientação fornecida, e pelo incentivo;

Ao Prof. Fábio Jesus de Castro pela amizade e ensinamentos em hematologia;

Aos amigos e professores Gerson e Paiva, pelo incentivo, companheirismo, ensinamentos e momentos de entretenimento;

Ao meu grande amigo e companheiro Décio Reis por toda ajuda cedida;

Ao técnico de laboratório Paulo, pelos ensinamentos;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da UFT, pela oportunidade;

À secretária Eline, pelos préstimos servidos sempre com eficiência;

Aos nossos estagiários Joaquinésio, Leonardo, Jefferson, Jaislane, Pamyliuk e Max, pela amizade e ajuda no manejo dos animais;

À minha esposa e acima de tudo companheira Suzana, que sempre me apoiou neste trabalho, me fornecendo o suporte necessário para mais esta vitória, meu muito obrigado.

À minha filha Beatriz que foi a razão do meu incentivo para concluir esta difícil etapa de minha vida;

Aos amigos e companheiros Diego, Laerton, Ronyere, Hamilton e Nelson pela amizade profícua, que, como amigos (a) e companheiros (a), sempre estiveram junto comigo, contribuindo com idéias e sugestões indispensáveis para este trabalho.

Aos funcionários da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFT, pela amizade e apoio;

Aos meus colegas de turma pelos conhecimentos compartilhados;

Aos professores da UFT, que me estimularam intelectualmente;

Ao excelentíssimo senhor Desembargador Antônio Félix Gonçalves pela doação dos peixes utilizados no experimento.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida para a realização do mestrado.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Degradação dos recursos hídricos.....	13
2.2 Organofosforados na piscicultura.....	14
2.3 Uso e principais efeitos do triclorfon na piscicultura.....	15
2.4 Estudos ecotoxicológicos.....	17
2.4.1 Ecotoxicologia.....	17
2.4.2 Risco ecotoxicológico.....	18
2.5 Indicadores biológicos no monitoramento ambiental.....	20
2.5.1 Toxicologia aguda.....	21
2.5.2 Toxicologia crônica.....	22
2.6 Biomarcadores.....	23
2.6.1 Aplicação dos biomarcadores.....	24
2.6.2 Classificação dos biomarcadores.....	25
2.7 Parâmetros hematológicos como biomarcadores.....	26
2.8 Micronúcleo em peixes como biomarcador.....	28
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Organismo teste.....	31
4.2 Coleta e manutenção dos animais.....	32
4.3 Toxicidade aguda.....	32
4.3.1 Determinação da $CL_{50-96h}$ .....	32
4.4 Toxicidade subaguda.....	33
4.4.1 Desenho experimental.....	33
4.4.2 Parâmetros hematológicos.....	33
4.4.3 Frequência de micronúcleo.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Características físico-químicas da água.....	36

5.2 Concentração letal média (CL <sub>50-96h</sub> ).....	36
5.3 Parâmetros sanguíneos.....	38
5.3.1 Avaliação da série vermelha.....	38
5.3.2 Avaliação da série branca.....	39
5.4 Frequência de micronúcleo .....	40
6 DISCUSSÃO.....	42
6.1 Parâmetros de qualidade da água.....	42
6.2 Concentração letal média - CL <sub>50-96h</sub> .....	42
6.3 Efeitos nos parâmetros hematológicos: série vermelha.....	45
6.4. Efeitos nos parâmetros hematológicos: série branca.....	47
6.4.1 Leucócitos.....	47
6.4.2 Linfócitos.....	48
6.4.3 Monócitos.....	49
6.4.4 Neutrófilos.....	49
6.4.5 Trombócitos.....	50
6.5 Frequência de micronúcleos (MNC%).....	51
7 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

## RESUMO

### **Toxicidade aguda e subaguda do triclorfon no tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1836)**

O uso extensivo de defensivos agrícolas é a principal causa da contaminação ambiental. A utilização de organofosforados tem sido recomendada em pisciculturas, principalmente, o triclorfon para o controle de parasitoses. A presença deste xenobiótico no ambiente aquático pode causar alterações fisiológicas e até a morte dos animais, levando a perdas econômicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, pela avaliação da concentração letal média ( $CL_{50-96h}$ ) e verificar se houve alterações fisiológicas em concentrações subletais utilizando parâmetros hematológicos e frequência de micronúcleos como biomarcadores. Na determinação da  $CL_{50-96h}$ , os animais foram acondicionados em caixas de fibra (500 L) onde permaneceram por vinte dias para adaptação e recuperação do estresse no transporte. Os indivíduos foram alimentados com ração comercial *ad libitum*, sendo interrompida 24 horas antes do início do experimento. Durante o período experimental os animais permaneceram em jejum. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos (controle, 0.125, 0.25, 0.50, 1.00 mg L<sup>-1</sup> de triclorfon), com três repetições não ultrapassando a densidade de 1g de peixe por litro. O bioensaio foi realizado em sistema semi-estático e a avaliação da mortalidade foi feita a cada 24 horas e ao final de 96 horas os resultados analisados pelo programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber sendo a  $CL_{50-96h} = 0.82$  mg L<sup>-1</sup>. Na avaliação dos efeitos subletais, amostras de sangue coletadas pela veia caudal, com seringas previamente lavadas com EDTA (10%) foram separadas em alíquotas para determinação do hematócrito, contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, índices hematimétricos, confecção de extensões sanguíneas para contagem total e diferencial de leucócitos e para a realização do teste do micronúcleo. Submeteu-se os resultados a análise de variância com 95% de confiabilidade. Alterações marcantes foram evidenciadas nos leucócitos, com elevação nas quantidades de linfócitos e trombócitos e redução nos monócitos. O teste do micronúcleo revelou possível ação genotóxica do triclorfon em tambaqui (*C. macropomum*), com aumento significativo na frequência de micronúcleos. Estes resultados apontam que mesmo em pequenas concentrações, o triclorfon causa alterações fisiológicas podendo comprometer a saúde dos animais e a viabilidade econômica da piscicultura.

Palavras-chave: biomarcadores, *Colossoma macropomum*, toxicidade, triclorfon.



## ABSTRACT

### **Acute and subacute toxicity of trichlorfon in tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1836)**

The extensive use of agricultural chemicals is the main cause of environmental contamination. The use of organophosphates has been recommended for fish, especially the trichlorfon to control parasites. The presence of xenobiotics in the aquatic environment may cause physiological changes and even death of animals leading to economic losses. The objective of this study was to evaluate the acute toxicity evaluation of the median lethal concentration (LC<sub>50-96h</sub>) and verify whether physiological changes in sublethal concentrations, using haematological parameters and frequency of micronuclei as biomarkers. In determining the CL<sub>50-96h</sub>, the animals were packed in boxes of fiber (500L) where they remained for twenty days for adaptation and recovery of stress in the transport. Individuals were fed commercial diets *ad libitum* and stopped 24 hours before the experiment. During the experimental period the animals remained unfed. The experimental design was a randomized with 5 treatments (control, 0.125, 0.25, 0.50 e 1.00 mg L<sup>-1</sup> trichlorofn) with three replicates not exceeding a density of 1g of fish per liter. The bioassay was conducted in semi-static system and assessment of mortality was done every 24 hours and the end of 96 hours the results were analyzed by statistical program Trimmed Spearman-Kärber and the CL<sub>50-96h</sub> = 0.82 mg L<sup>-1</sup>. In the assessment of sublethal effects, blood samples collected by tail vein with syringes previously rinsed with EDTA (10%) were separated into aliquots for determination of haematocrit, erythrocyte count, rate of hemoglobin, erythrocytes indices, construction of extensions to blood count total and differential counts of leukocytes and the realization of the micronucleus test. Submitted the results to analysis of variance with 95% reliability. Significant changes were found in leukocytes, with increase in the amounts of lymphocytes and thrombocytes and reduction in monocytes. The micronucleus test showed possible genotoxic action of trichlorfon on tambaqui (*C. macropomum*), with significant increase in the frequency of micronuclei. These results indicate that physiological changes may compromise the health of animal and the economic viability of farming.

Keywords: Biomarkers, *Colossoma macropomum*, toxicity, trichlorfon.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Caminho percorrido pelos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos (adaptado de Nimmo 1985).....	14
Figura 2	Fórmula estutural do triclorfon: $C_4H_8Cl_3O_4P$ .....	15
Figura 3	Etapas de avaliação de toxicidade. Fonte: modificado de USEPA, 2002.....	19
Figura 4	Biomarcadores de dose interna das substâncias químicas, para as quais o principal mecanismo de interação ocorre através da interação molecular (adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZAION, 1993).....	25
Figura 5	Exemplar de tambaqui, <i>C. macropomum</i> (Wt: $49,1 \pm 11,0$ g).....	31
Figura 6	Curva de regressão linear estimada para a mortalidade de tambaqui, <i>C. macropomum</i> , exposto a diferentes concentrações de triclorfon.....	37
Figura 7	Células de defesa orgânica (linfócitos, monócitos, trombócitos neutrófilos e) em tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ), coloração Panótico, aumento: 1000x.....	40
Figura 8	Eritrócitos de tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) contendo micronúcleo, coloração Ginsey 5%, aumento 1000x.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formas de tratamento do triclorfon na prevenção de parasitas (Kubitza & Kubitza, 2004).....	16
Tabela 2	Diretrizes da USEPA para determinação de riscos das substâncias tóxicas para organismos aquáticos.....	22
Tabela 3	variáveis físico-químicas da água no teste de toxicidade em Tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ), exposto ao triclorfon.....	36
Tabela 4	Mortalidade (%) de juvenis de tambaquis nas diferentes concentrações de triclorfon durante a determinação da CL <sub>50-96h</sub> .....	37
Tabela 5	Valores médios ± desvio padrão das variáveis eritrocitárias em juvenis de <i>Colossoma macropomum</i> , submetidos às concentrações (mg L <sup>-1</sup> ) subletais de Triclorfon.....	38
Tabela 6	Valores médios ± desvio padrão das células sanguíneas (série branca) e trombócitos em juvenis de <i>Colossoma macropomum</i> , submetidos às concentrações (mg L <sup>-1</sup> ) subletais de Triclorfon.....	39
Tabela 7	Valores (média ± desvio padrão) de frequência de micronúcleo em eritrócitos de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ) exposto a concentrações subletais de triclorfon.....	41
Tabela 8	Toxicidade aguda ao triclorfon para espécies de peixes – CL <sub>50</sub> .....	42

## 1 – INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia avalia o uso e a disposição de substâncias que possam causar problemas (direta ou indiretamente) aos ecossistemas, assim como seus efeitos nos organismos vivos. Os ecossistemas aquáticos têm ganhado mais atenção, pois além da contaminação proveniente do ar e do solo, nesses sistemas, outras substâncias podem eventualmente atingir o meio aquático na sua forma original ou como produto de transformação (BERTOLETTI, 1990).

Em ambientes aquáticos a contaminação pode não ser percebida imediatamente, pois esta não se dá de forma direta. Em áreas agrícolas, por exemplo, a lixiviação de águas superficiais e a infiltração da água intersticial para rios e lagos podem introduzir nutrientes e agrotóxicos, em quantidades substanciais (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

Os agrotóxicos estão sendo reconhecidos como importantes causadores de alterações ambientais, pois estes alcançam os ambientes aquáticos pela aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações (TOMITA & BEYRUTH, 2002).

Em pisciculturas, os organofosforados, são os mais utilizados no controle de parasitoses (RODRIGUES et al., 1997), no entanto, é feita de forma indiscriminada, causando danos fisiológicos e prejuízos econômicos. Dentre os organofosforados, o triclorfon tem sido recomendado por alguns autores, como Kubitzka (1998) e Pavanelli et al. (1999).

A preocupação ambiental nos ecossistemas tropicais aumentou na última década. Pesquisas têm sido realizadas sobre o impacto de contaminantes nos ecossistemas tropicais e, sendo assim, a ecotoxicologia torna-se importante ferramenta na elucidação dos efeitos de contaminantes em organismos aquáticos e terrestres nativos (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

Na ecotoxicologia, a avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos e da saúde animal tem requerido o desenvolvimento de biomarcadores para o estudo da poluição ambiental (MIRANDA, 2006). Assim, a caracterização dos efeitos tóxicos nos organismos aquáticos pode ser avaliada pela mortalidade (efeito letal), por alterações no crescimento, patológico, bioquímico e fisiológico (efeitos subletais) (WHO, 1993).

Com o intuito de alertar produtores, consumidores e os demais profissionais envolvidos na cadeia piscícola sobre os possíveis efeitos negativos da utilização de quimioterápicos no controle de parasitoses, o presente estudo visa investigar a ação do inseticida, triclorofon, recomendado nos sistemas de produção, sobre o tambaqui (*Colossoma macropomum*).

## **2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

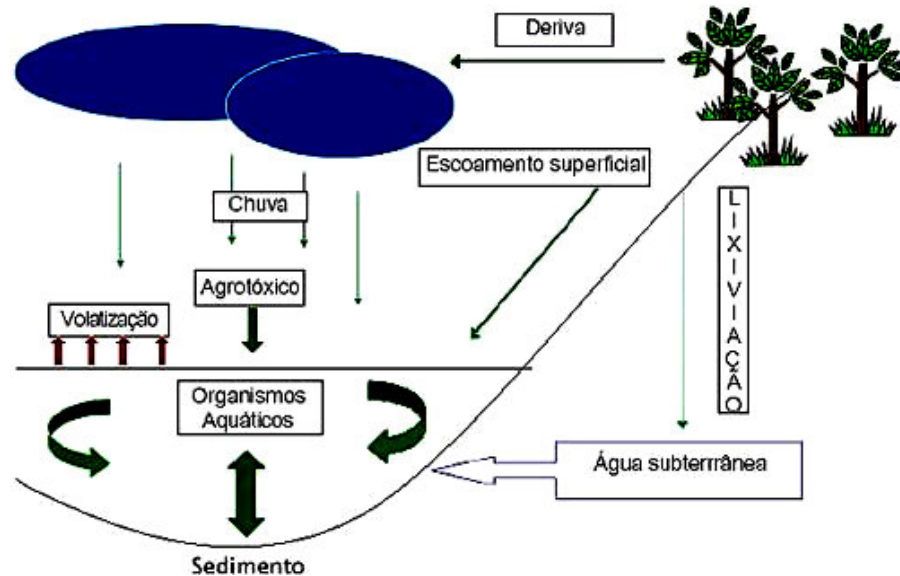
### **2.1 - Degradação dos Recursos hídricos**

Água é um recurso ou bem econômico, porque é finita, vulnerável e essencial para a conservação da vida e do meio ambiente, também sendo considerada como um recurso ambiental, pois a alteração adversa desse recurso pode contribuir para a degradação da qualidade ambiental (BORSOI & TORRES, 1997). Nas últimas décadas, esse precioso recurso natural vem sendo ameaçado pelas ações indevidas do homem, o que acaba resultando em prejuízo para a própria humanidade (MORAES & JORDÃO 2002).

O Brasil possui grande extensão de recursos hídricos, no entanto, também tem a tendência de desperdiçá-los. A precariedade dos sistemas de água e de esgoto sanitário e industrial, o uso de soluções defensivas agrícolas, a inadequação para o destino do lixo, a ausência ou insuficiência de medidas de proteção dos mananciais, e os níveis de poluição e contaminação hídrica, atmosférica, do solo, do subsolo e alimentar (MAGALHÃES, 1995), contribuem pela degradação do ambiente aquático.

Segundo Barros, SILVA & Sosa (2005) as principais causas da deterioração das bacias hidrográficas e, conseqüentemente, dos mananciais, são: desmatamentos, a falta de conservação dos solos, lavouras e estradas, assoreamento, introdução de agrotóxicos, poluição por esgotos e lixos domésticos e hospitalares, esgotos industriais e da agricultura (por agrotóxicos e suas embalagens) e a expansão urbana, com a ocupação desordenada do solo, sem planejamento ambiental ou urbano adequado.

Os agrotóxicos são reconhecidos como causadores de alterações ambientais e podem alcançar os ambientes aquáticos pela aplicação intencional, deriva e escoamento superficial a partir de áreas onde ocorreram aplicações (TOMITA & BEYRUTH, 2002). E a percolação desses pelo perfil dos solos pode ocasionar a contaminação de lençóis freáticos, sendo transportados pelo sistema aquático por difusão nas correntes de água ou nos corpos dos organismos aquáticos (SILVIA & SANTOS, 2007), assim a contaminação pode ocorrer em animais que se encontram longe do foco de poluição (Figura 1).



**Figura 1** - Caminho percorrido pelos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos (adaptado de Nimmo, 1985).

Dependendo das características físico-químicas, o resíduo do agrotóxico uma vez na água, pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser desintoxicado ou acumulados (SILVIA & SANTOS, 2007). Nesse contexto, os peixes são os mais afetados por estarem no topo da cadeia alimentar, podendo ainda servir de veículo de contaminação ao homem via consumo.

## 2.2 – Organofosforados na piscicultura

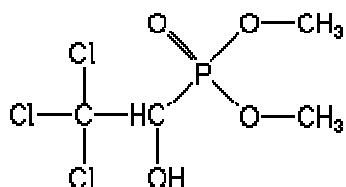
A piscicultura é uma atividade importante como fonte de proteína animal para o consumo humano, no entanto, o desenvolvimento da aquicultura nos últimos anos enfrenta problemas relacionados à alimentação, qualidade da água, doenças infecciosas e parasitárias com significativos prejuízos econômicos (CECCARLLI et al., 1990; PAVANELLI et al., 2002; MARTINS et al., 2002).

Ataques de predadores ou parasitas causam prejuízos devido à redução no crescimento e mortalidade, sendo os insetos aquáticos considerados os que mais causam perdas na fase de alevinagem (GARÁDI et al., 1988). Na aquicultura os inseticidas organofosforados são empregados no controle de odonatas, principal

inseto predador de peixes (MATAQUEIRO, 2002) e utilizados no controle e tratamento de demais predadores (CARR & CHAMBERS, 1996). Na piscicultura estes tem a finalidade de eliminar e controlar ectoparasitas (RODRIGUES et al., 1997).

Os organoclorados apresentam maior persistência no meio ambiente e tendência de acumulação na cadeia trófica, ao contrário dos organofosforados que são mais biodegradáveis e apresentam menor persistência no ambiente (BEGUM & VIJAYARAGHAVAN, 1995; VARÓ et al., 2000; PEHKONEN & ZHANG, 2002; SOGORB & VILANOVA, 2002; NEMR & ABD-ALLAH, 2004). Com isso os pesticidas organofosforados têm sido usados em substituição aos compostos organoclorados nas atividades agrícolas (VARÓ et al., 2000; PEHKONEN & ZHANG, 2002). No entanto, seu uso resulta em poluição ambiental, contaminação dos peixes de cultivo e demais organismos da cadeia aquática (RANZANI-PAIVA et al., 1997 & RODRIGUES et al., 1997). A utilização dos organofosforados no controle de ectoparasitas na piscicultura tem causado alterações fisiológicas em peixes mesmo em concentrações subletais (RODRIGUES et al., 1997).

### 2.3 – Uso e principais efeitos do triclorfon na piscicultura



**Figura 2** – Fórmula estrutural do triclorfon:  $C_4H_8Cl_3O_4P$

IUPAC: dimetil (RS)-2,2,2-tricloro-1-hidroxietilfosfanato

Sinonímias: Dipterex®, Tugon®, Neguvon®, Dylox® e Metrifonato®.

O triclorfon apresenta pequena persistência no ambiente e pouco deslocamento para áreas vizinhas sendo amplamente empregado nas lavouras de algodão, amendoim, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, feijão, girassol, soja, trigo e pastagens, no controle de pragas (ANDREI, 1996).

Na piscicultura é recomendado por Kubitzka (1998) no combate de parasitas, pois o ambiente aquático facilita a transmissão de parasitas, principalmente entre os peixes contidos em tanques de cultivo. A incidência de distúrbios de ordem



ambiental, como alterações na qualidade da água e estresse, bastante comuns nos sistemas de cultivo intensivo, geram impactos negativos sobre os mecanismos de defesa dos peixes, tornando os peixes mais susceptíveis aos parasitas e patógenos, favorecendo o crescimento excessivo da população destes e o estabelecimento de doenças (KUBITZA & KUBITZA, 2004).

De acordo com Garádi (1988), o triclorfon seleciona zooplâncton, eliminando variedades de odonatas, copépodes e cladóceros, sobrevivendo rotíferos que são alimentos indispensáveis às pós-larvas, sendo ainda indicado na eliminação de trematódeos, “piolhos” e copépodes (JUAREZ & ROUSE, 1983). O triclorfon é recomendado (Tabela 1) em tanques e viveiros com carpa comum (*Cyprinus carpio*), carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), tilápias e black bass (*Micropterus salmoides*) (KUBITZA & KUBITZA, 2004). Também, recomenda-se a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> pelo período de três dias para controle de girodactilídeos e dactilídeos e concentração 2,5 g L<sup>-1</sup> no controle de copépodos e ergasilidae, em banhos de imersão de cinco a dez minutos, repetidos quatro vezes por semana (PAVANELLI et al., 1999).

**Tabela 1** - Formas de tratamento do triclorfon na prevenção de parasitas.

Forma de tratamento	Dosagem utilizada
<b>Banhos indefinidos de longa duração</b>	0,13 a 0,25g IA/m <sup>3</sup>
<b>Banhos curtos</b>	1 a 2,5g IA/m <sup>3</sup>
<b>Banhos de imersão</b>	10g IA/L

Fonte: Kubitza & Kubitza, 2004

IA – Ingrediente ativo

Para Mataqueiro (2006), o tratamento feito com banhos em concentrações altas por um período curto de tempo pode acabar matando os peixes durante o tratamento. No entanto, a utilização com baixas concentrações efetivas do praguicida é capaz de controlar o parasito sem matar o peixe (FLORES-NAVA & VIZCARRA-QUIROZ, 1988).

A toxicidade no ambiente pode ser afetada por fatores como temperatura, pH e dureza da água, os quais apresentam diferentes efeitos sobre as espécies (Hudson et al., 1984). Kubitza & Kubitza (2004) recomendam aplicação do triclorfon

em águas com elevada alcalinidade, devido ao potencial tóxico em águas com baixa alcalinidade ( $AT < 30\text{mg de CaCO}_3/\text{L}$ ), principalmente quando doses acima de 0,25 mg de ingrediente ativo por litro (IA/L) ou 0,25 g de IA/m<sup>3</sup> são aplicadas. O triclorfon sofre inicialmente uma transformação estrutural para exercer sua ação tóxica (HIRATA et al., 2003). Assim, o diclorvós é o metabólito que causa ação mais tóxica. Metecalf et al. (1959) estudaram a desidratação do triclorfon, demonstrando ser desprezível em pH 5,4, porém, atingindo taxa de 60% após duas em pH 8,0.

Segundo Tomlin (1995), o triclorfon é um inseticida não sistêmico com ação de contato e ingestão que inibe a enzima acetilcolinesterase no sistema colinérgico do sistema nervoso dos organismos vivos, causando assim alterações fisiológicas nos peixes e intensificando a transmissão do impulso nervoso (AGUIAR et al., 2004).

Em peixes a inibição da enzima acetilcolinesterase, pela formação do complexo irreversível, faz com que as fibras musculares fiquem em constante estado de contração (AROUCO, 2002).

## **2.4 – Estudos ecotoxicológicos**

Segundo Mataqueiro (2006), medidas preventivas e corretivas para preservação e proteção da flora e da fauna aquática, baseiam-se em estudos ecotoxicológicos, por meio dos quais são estabelecidos limites aceitáveis de poluentes na água. A avaliação ecotoxicológica é importante para o controle, regulamentação e classificação de novas substâncias tóxicas quanto ao potencial de risco ambiental (CRUZ et al., 2004).

### **2.4.1 – Ecotoxicologia**

Em 1969, durante reunião do “Committee of the International Council of Scientific Unions” (ICSU), o termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez pelo toxicologista francês René Truhaut. Após esse evento foi formado o Comitê Científico do ICSU sobre os Problemas Ambientais (SCOPE), o qual foi responsável pela organização do grupo de trabalho sobre essa nova ciência. (TRUHAUT, 1997 apud ZAGATO, 2006).

Segundo Chapman (2002), os estudos ecotoxicológicos no meio ambiente são caracterizados pelo conceito inicial da toxicologia ambiental ou pela toxicologia

ecológica (ecotoxicologia), sendo definida como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera (ZAGATO, 2006).

#### **2.4.2 - Risco ecotoxicológico**

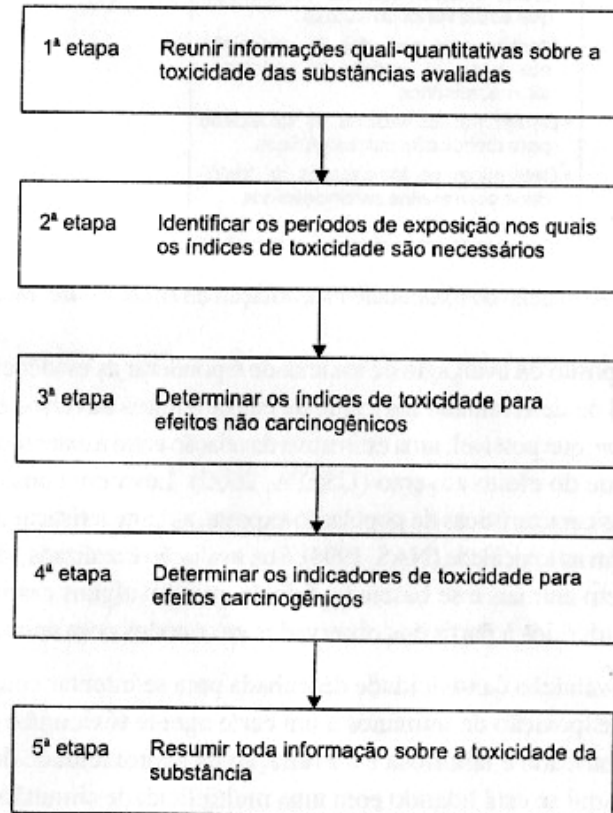
Medidas para avaliar e gerenciar os riscos ao homem e aos sistemas naturais tornaram-se exigência da sociedade internacional, assim como o desenvolvimento de ferramentas que permitam a avaliação quali-quantitativamente dos riscos químicos, físicos e biológicos tornando-se prioridade internacional (HACON, 2003).

Risco pode ser definido como uma função da probabilidade da ocorrência de um evento indesejado, com severidades diferenciadas em relação aos efeitos adversos à saúde humana, à propriedade ou ao ambiente (OECD, 2000 apud HACON, 2003). Também pode ser a probabilidade de que algum efeito adverso aconteça, sendo o efeito adverso definido como um julgamento de valor, podendo se constituir de morte, doença, diminuição da qualidade de vida, prejuízos econômicos, danos ambientais e outros (NARDOCCI, 2003). No entanto, este conceito sofreu complementação, onde a quantificação passou a ser necessária (HACON, 2003).

Os riscos têm duas origens: a natureza, a partir de fenômenos naturais, ou do próprio homem, com atos, atividades ou obras que geram riscos artificiais específicos (VIERA, 2005) e são classificados em objetivos, onde é avaliado pela utilização de cálculos estatísticos e metodologias quantitativas, e em subjetivas que são avaliados com base em julgamentos intuitivos (NARDOCCI, 2003).

A função precípua da toxicologia é conhecer o risco de ocorrência do efeito tóxico, onde a avaliação do risco deve ser composta pela associação das técnicas de avaliação de risco ecológico e à saúde humana a partir da abordagem de avaliação de risco integrada, denominada Avaliação de Risco Socioambiental (ARSA) (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

O Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos, em 1983, fundamentou o processo de identificação e avaliação dos riscos para a saúde pública a partir da divisão do mesmo em quatro etapas: identificação do perigo, avaliação da exposição, avaliação da toxicidade (relação dose-resposta) e caracterização do risco (EDULJGE, 2000 apud GRADVOHL, 2006) (Figura 3).



**Figura 3** – Etapas de avaliação de toxicidade. Fonte: modificado de USEPA, 2002

A identificação do perigo é o processo que tenta reconhecer se a exposição a determinado agente pode estar relacionada ao aumento de incidência de determinado efeito adverso, como por exemplo, câncer ou defeito congênito, e se há possibilidade de seu efeito ocorrer no homem (HACON, 2003).

A avaliação da exposição determina a dose recebida pelos indivíduos expostos aos agentes identificados, que pode ser feita diretamente pela coleta e análise de amostras ambientais, ou mesmo diretamente na população exposta, por meio de bioensaios, onde, é necessário que a população já tenha sido exposta ao agente (NARDOCCI, 2003).

Na avaliação da dose-resposta, o objetivo é a relação entre a quantidade da substância tóxica sob a qual o organismo está exposto e o risco que existe para que essa exposição cause prejuízos à saúde (METCALF & EDDY, 2003). Essa visão quantitativa da relação dose-resposta permite a formulação dos índices de toxicidade e podem ser usados para estimar a incidência ou potencial do efeito adverso (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

A quantificação ou caracterização do risco é a última fase e traz consigo as informações das etapas reunidas para, então, estimar o risco existente. Esta etapa procura integrar a exposição e a avaliação da dose-resposta para chegar às probabilidades quantitativas que indicarão os efeitos que poderão correr nos organismos expostos (GRADVHOL, 2006).

Nos processos de avaliação de riscos ecotoxicológicos, o uso de biomarcadores pode responder questões ambientais que não são resolvidas a partir de outros procedimentos mais comuns como questionários e determinações de concentrações ambientais (GRADVHOL, 2006). Assim os biomarcadores são valiosos na avaliação sobre riscos oriundo da exposição e apresentam valor laboratorial e epidemiológico.

## **2.5 – Indicadores biológicos de monitoramento ambiental**

Em ambientes aquáticos, para se conhecer os efeitos de agentes xenobióticos, têm sido utilizados testes de toxicidade com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e ou campo (MARTINEZ & CÓLUS, 2002). Segundo Rand & Petrocelii (1985) a caracterização dos efeitos tóxicos nos organismos aquáticos pode ser avaliada pela mortalidade (efeito letal), por alterações no crescimento, patológico, bioquímico e fisiológico (efeitos subletais).

Diversas modalidades de testes, como teste de toxicidade aguda, toxicidade crônica, biodegradação e de bioacumulação, além dos testes subletais, encontram-se sob a denominação de bioensaios que podem ser reunidos em três grupos básicos: bioquímicos e fisiológicos, histológicos e comportamentais (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

O termo degradação refere-se ao processo pelo qual uma substância química de estrutura complexa é convertida em molécula mais simples englobando: a degradação abiótica, onde ocorrem transformações como fosforilação, fotólise, oxidação/redução; a degradação biótica ou biodegradação onde ocorre ação de microrganismos presentes no ambiente, os quais utilizam tais substâncias como substrato (BURATINI, 2006a).

A bioacumulação é o termo que designa o processo em que substâncias químicas provenientes do ambiente são assimiladas e retidas pelos organismos,

onde inclui-se a absorção a partir de todas as vias de exposição (respiração, nutrição, epiderme) e compartimentos em que os contaminantes estejam presentes no meio aquático (BURATINI, 2006b).

### 2.5.1 - Toxicidade aguda

Os testes de toxicidade possuem como objetivo avaliar os danos causados a organismos aquáticos, onde organismos representativos da biota aquática são submetidos a várias concentrações de uma ou mais substâncias poluidoras, durante um determinado período de tempo (PAWLOWSKY, 1994). A nocividade de uma determinada substância para um organismo é comumente avaliada pela utilização do teste de toxicidade aguda, devido à facilidade da coleta de dados com o aparecimento rápido dos sintomas logo após o contato (BAIRD, 2002).

Segundo Paine (1993) esses estudos visam demonstrar a ocorrência de efeito adverso num curto período com procedimentos protocolares. Geralmente, trata-se da administração de uma única dose (ou concentração x tempo nos estudos de ecotoxicidade) ou exposições múltiplas em 24 horas. Considera-se o aparecimento de efeito num período de até 14 dias. (AZEVEDO & CHAIN, 2003).

No estudo da toxicidade aguda, frequentemente determina-se a dose letal média ( $DL_{50}$ ) ou concentração letal média ( $CL_{50}$ ), nos casos de inalação, absorção dérmica ou em ambiente aquático. Normalmente, as provas baseiam-se na verificação do evento letal nas 24 horas que se seguem à administração e no acompanhamento dos sobreviventes até 7 dias (AZEVEDO & CHAIN, 2003). Geralmente pode ser definido graficamente ou analiticamente usando métodos binomiais, de média móvel ou *probit*, onde se utiliza um intervalo de confiança de 95% (METCALF & EDDY, 2003).

Agências federais e estaduais utilizam do conceito de unidades tóxicas (TU – unidades), descrita na Form. 1, para definições de limites padrões de contaminação ambiental (METCALF & EDDY, 2003).

$$T_{ua} = \frac{100}{CL_{50}} \quad (1)$$

## 2.5.2 - Toxicidade crônica

Para determinar o efeito crônico de uma substância, os animais são expostos por períodos prolongados: superior a três meses ou até o período normal de vida da espécie animal (AZEVEDO & CHAIN, 2003). O termo “teste de toxicidade crônica” é usado como sinônimo para “testes de longa duração”, podendo durar de 2 a 7 anos, dependendo da espécie, as quais são selecionadas segundo os resultados dos estudos subcrônicos e toxicodinâmicos (BALLANTYNE, 1997 apud AZEVEDO & CHAIN, 2003). Ao final dos testes, deve-se realizar autópsia completa em todos os animais, incluindo histologia de todos os órgãos (Opas/USEPA, 1996)

A Tabela 2 a seguir demonstra as diretrizes da USEPA para determinação de riscos das substâncias tóxicas para organismos aquáticos.

**Tabela 2** – Diretrizes da USEPA para determinação de riscos das substâncias tóxicas para organismos aquáticos.

<b>Pressuposição Regulamentadora</b>	<b>Toxicidade Aguda</b>	<b>Toxicidade Crônica</b>
<b>Sem riscos</b>	$EEC < 1/10 LC50$	$EEC < \text{nível sem efeito crônico}$
<b>Riscos que podem ser mitigados mediante restrição de uso</b>	$1/10 LC50 \leq EEC < 1/2 LC50$ $EEC \geq 1/10 LC50$	Não aplicável
<b>Risco inaceitável</b>	$EEC \geq 1/2 LC50$	$EEC \geq \text{níveis com efeitos crônicos, inclusive efeitos reprodutivos.}$
<b>Espécies não ameaçadas</b>		
<b>Risco inaceitável</b>	$EEC > 1/20 LC50$ ou	$EEC \geq \text{níveis com efeitos crônicos, inclusive; além de qualquer modificação nos habitats}$
<b>Espécies em risco</b>	$EEC > 1/20 LC50$	

\* EEC (Concentração ambiental). Fonte: URBAN; CROOK, 1996 apud MATSUI, 2002, p. 26.

## 2.6 – Biomarcadores

Em 1987 quando o termo surgiu, foi proposta uma definição, sendo estabelecido que biomarcadores fossem indicadores que assinalavam eventos em sistemas ou amostras biológicas sob exposição a contaminantes químicos na qual a ênfase era dada em efeitos humanos (NASCIMENTO et al., 2006). Posteriormente, foi definido como qualquer resposta biológica a químicos ambientais no indivíduo ou em parte dele, a qual demonstre uma alteração do estado normal do organismo (PEAKALL, 1999). Atualmente são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (NASCIMENTO, 2006).

Desta forma, o biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde (WHO, 1996), permitindo detectar contaminação ambiental, avaliar a magnitude da contaminação e identificar espécies ou populações em risco de contaminação (STEGEMAN et al., 1992).

O processo de seleção e validação dos indicadores biológicos requer cuidado em relação à especificidade e sensibilidade, assim como a medida da exposição e a manifestação dos efeitos observados (AMORIM, 2003). A validação é um processo utilizado para estabelecer a relação quantitativa e qualitativa do biomarcador com a exposição, em função da substância química e do objetivo selecionado (WHO, 1993).

Para que uma substância química, seu metabólito ou uma alteração biológica sejam validados e/ou propostos como biomarcador, é desejável que o mesmo apresente as seguintes características: (WHO, 1993).

a) A quantificação do indicador deve:

- refletir a interação (qualitativa ou quantitativa) do sistema biológico com a substância química;
- ter conhecida e apropriada sensibilidade e especificidade para a interação;
- ser reprodutível qualitativamente e quantitativamente.

b) Estar contido em um meio biológico acessível de análise, considerando a necessidade de manutenção da integridade da amostra entre a coleta e o procedimento analítico, e de preferência não ser invasivo.



- c) A medição analítica tem que apresentar exatidão e precisão adequadas.
- d) Conhecer os valores normais do indicador em populações não expostas ao agente químico de interesse, assim como as variações intra e inter-individuais.

É crescente o número de trabalhos onde peixes são empregados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (SILVIA FILHO, 2000). Os peixes ocupam os mais diversos ambientes aquáticos e são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta em muitos países e, em vários outros são a principal fonte de proteínas da população (SILVIA FILHO et al., 2000). Vários trabalhos fazem uso destes animais para avaliar o efeito do estresse causado por variações no ambiente aquático (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

### **2.6.1 - Aplicação dos Biomarcadores**

Os Biomarcadores são usados para vários propósitos, dependendo da finalidade do estudo e do tipo da exposição química e têm como objetivos avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna), os efeitos das substâncias químicas e avaliar a suscetibilidade individual. (AMORIM, 2003).

Os Biomarcadores podem ser utilizados no diagnóstico clínico para (WHO, 1993):

- a) confirmar diagnóstico de intoxicação aguda ou crônica;
- b) avaliação da efetividade de tratamento;
- c) avaliar o prognóstico de casos individuais.

Os biomarcadores podem ser usados ainda na atividade de monitoramento para confirmar a exposição individual ou de uma população a uma determinada substância química e avaliar o risco, quando comparados com uma referência apropriada (AMORIM, 2003). Sabendo-se que o monitoramento ambiental é realizado para reduzir as exposições ocupacionais e comprovar se as medidas preventivas adotadas no ambiente são satisfatórias, o monitoramento biológico tem como meta principal verificar se existe segurança enquanto ocorre a presença do agente químico no ambiente de trabalho, em exposições presentes, e inclusive passadas, para evitar a ocorrência de efeitos adversos à saúde (WHO, 1993 apud AMORIM, 2003).

## 2.6.2 - Classificação dos biomarcadores

Vários autores classificam os biomarcadores independentemente da finalidade e aplicação onde são divididos em três tipos (NASCIMENTO et al., 2006).

1- Os biomarcadores de exposição são os que estimam a dose interna ou biodisponibilidade de um xenobiótico particular ou de seus metabólitos em um organismo exposto devendo representar uma resposta bem caracterizada que leve em conta à farmacodinâmica e as propriedades físico-químicas do organismo e agente, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2006). Os biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna e refletem a distribuição da substância ou seu metabólito pelo organismo e por isso são identificados como dose interna (AMORIM, 2003).

Teoricamente, a distribuição da substância no organismo pode ser traçada por meio de vários níveis biológicos, como tecidos e células, até seu alvo definitivo (AMORIM, 2003) como mostra a Figura 4.



**Figura 4** - Biomarcadores de dose interna das substâncias químicas, para as quais o principal mecanismo de interação ocorre por meio da interação molecular (adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993).

2 - Os biomarcadores de efeito, em geral, não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse sua atuação e são caracterizados pela indução de mecanismos de defesa celular, que se iniciam sempre como uma resposta adaptativa em nível molecular-bioquímico. (NASCIMENTO et al., 2006).

Biomarcadores de efeito podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde, decorrentes da exposição e absorção da substância química, assim, dessa forma, a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeitos contribui para a definição da relação dose-resposta. (AMORIM, 2003).

3 - Os biomarcadores de suscetibilidade indicam a habilidade inerente ou adquirida por um organismo de responder à exposição a um xenobionte e elucidam as variações no grau de resposta diferencial entre organismos e demonstra a tolerância fisiológica adquirida ou controlada por expressão genética hereditária (OOST et al., 2003). Organismos ainda sendo da mesma espécie, não respondem igualmente à exposição à xenobióticos, sendo sexo, jejum, estresse pelo confinamento, tamanho e estágio de desenvolvimento parâmetros de variação nas respostas a estressores, bem como o polimorfismo genético de uma população. (NASCIMENTO et al, 2006).

Embora alguns indivíduos experimentem exposição ambiental similar, diferenças genéticas no metabolismo podem produzir doses marcadamente diferentes no sítio crítico e, conseqüentemente, nível diferente de resposta. Até mesmo quando as doses críticas são similares, respostas diferentes podem ser notadas nos indivíduos devido a variações na suscetibilidade biológica. (AMORIM, 2003).

## **2.7 - Parâmetros Hematológicos como biomarcadores**

Em estudos de toxicidade, biomarcadores em nível suborgânico (bioquímico, fisiológico e histológico) têm sido utilizados e considerados mais viáveis para avaliar as respostas aos estressores. Estes biomarcadores podem permitir uma avaliação mais rápida da saúde dos organismos e podem ser indicadores da exposição ou dos efeitos dos poluentes (MAYER et al., 1992). Segundo Brigdes et al. (1976) as

características sanguíneas de peixes mudam em respostas as condições ambientais, então a variação hematológica serve como biomarcadores de estresse.

A composição sanguínea está sujeita a fatores fisiológicos e ecológicos, como o sexo, o estágio de desenvolvimento gonadal, o estresse, as infecções, o peso e o comprimento corporal do peixe (MCCORMICK & NAIMAN, 1985). A evolução do estado fisiológico dos peixes pode ser avaliada pelos índices hematimétricos (VOSYLIENÉ, 1999). A avaliação desses parâmetros auxilia na determinação da influência de condições fisiopatológicas que possam afetar a homeostase, colaborando, assim, no diagnóstico de condições adversas (TAVARES-DIAS et al., 1999a).

O estudo dos parâmetros hematológicos vem sendo cada vez mais utilizado como avaliação do estado fisiológico em peixes (RANZANI-PAIVA et al., 1997; TAVARES-DIAS et al., 1999; TAVARES-DIAS et al., 2001; TAVARES-DIAS & MORAES, 2004; MELO et al., 2006; FRANÇA et al., 2007; SOSO et al., 2007). Assim as variações dos parâmetros hematológicos podem ser utilizadas como indicadores de disfunção orgânica por estresse (VALENZUELA et al., 2003)

A análise de sangue de animais é frequentemente realizada para se avaliar as alterações provocadas nos peixes pela contaminação ambiental. O estudo do sangue facilita a detecção de alterações patológicas no organismo e ajuda a identificar a extensão e a natureza dos desvios das condições normais (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2000).

Em teleósteos o rim cefálico e o baço são os principais órgãos hematopoiéticos (PIMPÃO, 2006). Segundo Dheer et al., (1987), a hematopoiese sofre influência de fatores biológicos e ambientais, assim a presença de xenobióticos pode ser caracterizada como alteração ambiental, pois mesmo em concentrações aceitáveis causam distúrbios fisiológicos. Algumas mudanças podem ser resultado de desordens na permeabilidade das membranas dos eritrócitos e ou resultado da ativação de mecanismos de proteção que incluem liberação de eritrócitos de depósitos de sangue ou tecidos hematopoiéticos na corrente sanguínea (SVOBODOVÁ et al., 1994). Com isso, segundo Cazenave (2005) a hematologia fornece informações relevantes sobre a fisiologia geral e saúde dos organismos vivendo em condições de estresse.

## 2.8 – Micronúcleo em peixes como biomarcador

Micronúcleos são corpúsculos formados por cromossomos que se encontram dispersos no citoplasma por não terem sido ligados ao fuso cromático durante a divisão celular (RODRIGUES & CASTILHOS, 2003) sendo facilmente visualizados em eritrócitos, onde a formação de núcleos bilobados indica o início de alterações no metabolismo celular (PALHARES & GRISOLA, 2002). Embora a presença de micronúcleos possa ocorrer de forma espontânea, peixes são utilizados como organismos sentinelas indicando o grau de exposição aos genotóxicos e são considerados os maiores vetores na transferência de contaminação aos humanos (HOSE et al., 1987; DITTMAR, 2005).

Estas deformações nucleares podem ser causadas pela exposição de organismos vivos a substâncias tóxicas presentes no meio. Maior parte dessas substâncias é encontrada em excesso no meio devido à ação antrópica em ecossistemas próximos a áreas urbanas e agroindustriais.

Genotoxicidade é um termo geral que se refere a alterações na estrutura geral ou na disposição dos cromossomos (clastogenicidade) ou seqüências de pares de bases do DNA (mutagenicidade) por exposição a agentes tóxicos (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Peixes são considerado por De Flora et al., (1993) como organismos adequados no monitoramento de genotoxinas aquáticas, por serem capazes de metabolizar xenobióticos e poluentes acumulados. Assim, os eritrócitos de sangue periférico são comumente usados para a aplicação teste do micronúcleo, utilizando peixes como bioindicadores para avaliação ambiental de contaminação genotoxicológica (BELPAEME et al., 1996; DA SILVA et al., 2002; RUSSO et al., 2004). O uso de células sanguíneas periféricas trás a vantagem de evitar o sacrifício do peixe, permitindo desta forma que sejam efetuados monitoramentos sucessivos das mesmas populações (LLORENTE et al., 2002).

No entanto, alguns fatores devem considerados quanto à espécie estudada, pois, a posição de determinada espécie na cadeia alimentar influencia na sua sensibilidade aos poluentes. Porto, Araujo & Feldberg (2005) demonstraram essa diferença, com as espécies *Prochilodus nigricanus* (detritívora), *Mylossoma duriventris* (onívora) e *Hoplias malabaricus* (piscívoro) onde a freqüência de micronúcleo na espécie piscívora foi cerca de cinco vezes maior que nas espécies

detritívora e/ou onívora, devido estar em um elevado nível trófico, sujeito a eventos de biomagnificação.

O teste do micronúcleo písceo é bastante utilizado em análises ambientais tendo em vista que estudos de genotoxicidade usando análises citogenéticas em peixes demonstram a sensibilidade destes organismos (AL-SABTI & METCALFE, 1995). Como o teste do micronúcleo é capaz de detectar tanto efeitos aneugênicos como clastogênicos, a genotoxicidade de uma grande variedade de compostos pode ser testada por meio dessa técnica (HEDDLE et al., 1991).

Como os peixes apresentam um grande número de cromossomos, e muitas vezes de pequeno tamanho, as análises das metáfases para avaliação de aberrações cromossômicas são dificultadas, enquanto que o estudo de micronúcleos é fácil e possível de ser realizada em eritrócitos, devido ao fato destes serem nucleados (HAYASHI et al., 1998).

He et al., (2000) verificaram maior sensibilidade para avaliação de dano no DNA para o ensaio do Cometa (eletroforese em gel de células individuais) que para o teste do micronúcleo. Resultados confirmados por Bücken et al. (2004) que não observaram diferenças significativas na frequência de MNC, pelo teste do micronúcleo, em *Eingermannia virescens* para exposição ao benzeno sendo observadas quando se utilizou o ensaio do Cometa. No entanto, o teste Cometa deve ser interpretado com cautela, devido sua elevada sensibilidade, além de não ser um teste de mutagênese, pois o dano pode ser reparado. Outro fator limitante deste teste é quanto ao tempo de preparo das lâminas que dever no máximo 24 horas. (Villela et al., 2003).

Estudo realizado por RUSSO et al. (2004), observaram redução na frequência de micronúcleo em peixes que foram retirados de áreas contaminadas e levados para condições laboratoriais, quando comparados os resultados entre amostras colidas no momento da captura e em água não poluída. Este resultado evidencia a presença de mecanismo molecular de reparação eficiente (DITTMAR, 2005), reforçando a idéia que o teste do micronúcleo é indicado para a detecção de em curto prazo de prejuízos cromossomiais (MINISSI et al., 1996; Russo et al., 2004).

### 3 – OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos toxicológicos do quimioterápico triclorfon em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Para tal propósito foram avaliados:

- Toxicidade aguda pela determinação da concentração letal média;
  
- Possíveis alterações fisiológicas em concentrações subletais, por meio de:
  - Parâmetros hematológicos.
  - Frequência de micronúcleo em eritrócitos.

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 – Organismo teste

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Figura 5) é uma espécie nativa da Bacia Amazônica e apresenta excelente potencial para o cultivo por apresentar bom crescimento, hábito gregário, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e excelente no aproveitamento de alimentos (SAINT-PAUL, 1986).

Pertencente à ordem dos Characiformes, família Serrasalminidae (GÉRY, 1977), o tambaqui foi introduzido nas pisciculturas do sul do país a partir da década de 70 (RANZANI-PAIVA et al., 1999). A maturidade sexual ocorre entre o terceiro e quarto ano de vida, em sua dieta natural incluem-se zooplâncton, frutos e sementes, sendo considerado onívoro com tendências frugívoras (HONDA, 1974). Não são tolerantes a temperaturas baixas, podendo morrer quando águas atingem temperaturas inferiores a 16 °C (RANZANI-PAIVA et al., 1999).



**Figura 5** – Exemplar de tambaqui, *C. macropomum* (Wt: 49,1±11,0 g; Lt: 12,0 ± 2,0 cm)



## 4.2 – Coleta e manutenção dos animais

Foram utilizados 150 exemplares de *C. macropomum*, coletados em piscicultura na região de Araguaína-TO e transferidos para o laboratório de Morfologia e Bioquímica da Universidade Federal do Tocantins, Campus Araguaína, permanecendo em caixas de 500 L, à temperatura de aproximadamente 25 °C durante vinte dias para aclimação. Os espécimes utilizados eram juvenis (Wt: 49,1 ± 11,0 g, Lt: 12,0 ± 2,0 cm), sem distinção de sexo e foram alimentados com ração balanceada. O fotoperíodo foi de 12 horas luz.

O processo de aclimação iniciou-se com o acondicionamento dos peixes em caixas de fibra de 500 litros, estocados de acordo com as densidades de 1,0 grama de peixe por litro, com renovação de aproximadamente 20% do total do volume por dia. Durante o período de vinte dias, os animais ficaram em observação para determinar possíveis doenças, presença de parasitas ou danos físicos e recuperação do estresse da captura e transporte. A alimentação foi fornecida em forma de ração extrusada, com 36% de proteína bruta, *ad libitum*, a qual foi interrompida 24 horas antes do início do experimento. Durante o teste de toxicidade aguda os juvenis permaneceram nas caixas de fibra com volume total de 500 litros (10 animais/caixa), dotadas de aeração artificial e em jejum.

## 4.3 – Toxicidade aguda

### 4.3.1 – Determinação da CL<sub>50-96h</sub>

O principal teste de toxicidade aguda é a determinação de CL<sub>50</sub>, normalmente, procura-se estimar a concentração da substância-teste que causa efeito a 50% da população exposta, durante um período de tempo determinado (AZEVEDO & CHANSIN, 2003; ZAGATO & BERTOLETTI, 2006).

A substância-teste foi o inseticida NEGUVON<sup>®</sup>, cujo princípio ativo é o triclorfon sendo encontrado na forma de pó, sendo utilizado na piscicultura para controlar ectoparasitas.

Os animais do grupo controle e expostos ao inseticida permaneceram em sistema semi-estático durante 96 horas. Foram realizados testes preliminares para determinação das faixas de concentração letal do inseticida. Com base na menor

concentração letal dos testes preliminares, calculou-se as concentrações definitivas, sendo utilizado o fator dois como base nas determinações das concentrações a serem testadas.

O monitoramento das variáveis físico-químicas da água como temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), condutividade elétrica ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ ), pH e oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ), iniciou-se após duas horas da contaminação, e posteriormente, a cada 24 horas.

Nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas foram registradas as mortalidades, sendo os indivíduos mortos retirados das caixas. A  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  foi determinada pelo método estatístico Trimmed Spearman Karber, com limite de 95% de confiança (HAMILTON et al., 1977).

#### **4.4 – Toxicidade subaguda**

##### **4.4.1 – Desenho experimental**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Foram separados dois grupos de animais, controle e exposto ao inseticida (doses subletais 0.125 e 0.25  $\text{mg L}^{-1}$ / 96 horas de exposição) em triplicatas. A análise estatística foi efetuada utilizando-se o programa computacional “Instat para Windows” onde a diferença estatisticamente significativa entre os valores dos animais expostos ao inseticida em relação ao controle foi detectada por meio de análise de variância ANOVA seguida pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Quando necessário foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ANOVA, seguido do teste de Dunn.

##### **4.4.2 – Parâmetros hematológicos**

Para as análises hematológicas, retirou-se aleatoriamente seis indivíduos de cada caixa. A coleta de sangue dos animais foi realizada pela punção da veia caudal com seringas lavadas com EDTA (10%) e em seguida foram sacrificados por secção da medula. Sub-amostras de sangue foram utilizadas imediatamente para a determinação do hematócrito (técnica de microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. 1971), hemoglobina (método de cianometahemoglobina, segundo Collier 1944) e contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer utilizando-se como diluente o líquido de Hayen. Os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM

(hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), segundo Wintrobe (1934).

Para os índices hematimétricos foram utilizadas as seguintes fórmulas:

- **Volume Corpuscular Médio (VCM)**

O VCM ajuda na observação do volume dos eritrócitos. Para realização de seu cálculo foram utilizados os valores do hematócrito e a contagem de eritrócitos, segundo a form.(2).

$$VCM = \frac{Ht \times 10}{RBC(mm^3)} \quad (2)$$

- **Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)**

O HCM é a concentração da hemoglobina por eritrócito. Para o cálculo, foram utilizados os valores de hemoglobina total e a contagem de eritrócitos, segundo a form.(3).

$$HCM = \frac{[Hg] \times 10}{RBC(mm^3)} \quad (3)$$

- **Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)**

A concentração de hemoglobina dentro do eritrócito é calculada pelo do CHCM. Para isso foram utilizados os valores de hemoglobina total e de hematócrito. Seu valor é obtido em porcentagem, como segue na form. (4).

$$CHCM = \frac{[Hg] \times 100}{Ht} \quad (4)$$

Foram confeccionadas lâminas de extensão sanguínea e coradas com PANÓTICO para contagem diferencial e total de leucócitos (Lc) e contagem total de

trombócitos (Tr), segundo metodologia recomendada por Hrubec e Smith (1998), com adaptações, utilizando a formula descrita a seguir na form. (5)

$$\text{Leucóцитos totais (por } \mu\text{L)} = \frac{NL \times NE}{2000}, \text{ onde:} \quad (5)$$

NL = número de leucóцитos

NE = número de eritróцитos (Câmara de Neubauer)

#### 4.4.3 – Frequência de micronúcleo

Para a análise da freqüência de micronúcleos em eritróцитos, retirou-se aleatoriamente seis indivíduos de cada caixa. A coleta de sangue já foi descrita. O teste de micronúcleo seguiu basicamente a metodologia descrita por Grisolia & Cordeiro (2000). Com as amostras de sangue confeccionou-se extensões sanguíneas que após secas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e coradas com Giemsa 5% por 5 minutos. Foi realizada análise em teste cego, ao microscópio de luz transmitida com 2000 células por animal para a contagem de micronúcleo em eritróцитos e consideradas as hemácias nucleadas com membranas nucleares e citoplasmáticas intactas. Micronúcleos foram considerados como corpúsculos que em relação ao núcleo apresentaram um terço do seu tamanho, estando nitidamente separados com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência. A quantidade de micronúcleo expressa em MNC% a qual expressa à freqüência de micronúcleo por 1000 é dada pela seguinte form. (6).

$$\text{MNC\%} = \frac{\text{Número de células contendo MN}}{\text{Número total de células contadas}} * 1000 \quad (6)$$

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – Caracterização físico-química da água

Os parâmetros físico-químicos (oxigênio, temperatura, pH, condutividade) da água utilizada no teste de toxicidade para tambaqui estão descritos na Tabela 3. Ao longo do período experimental não apresentaram variações que comprometessem os animais.

**Tabela 3** – Valores das variáveis físico-químicas da água (média±SD) no teste de toxicidade em tambaqui (*C. macropomum*), exposto ao triclorfon.

Concetração de triclorfon mg L <sup>-1</sup>	Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	pH	Condut. (uS\cm)
<b>Controle</b>	8,46±1,40	23,00±2,24	6,82±0,18	17,86 ± 0,42
<b>0,125</b>	6,68±1,50	24,68 ± 1,92	6,35±0,27	18,21 ± 0,47
<b>0,25</b>	7,79 ±1,26	24,56 ± 2,01	6,43±0,32	18,16 ± 0,32
<b>0,51</b>	7,15 ±1,60	24,78 ± 2,05	6,61 ± 0,16	17,33 ± 0,43
<b>1,00</b>	7,32 ±0,86	24,58 ± 1,91	6,24 ± 0,33	18,10 ± 0,16

### 5.2 – Concentração letal média (CL<sub>50-96h</sub>)

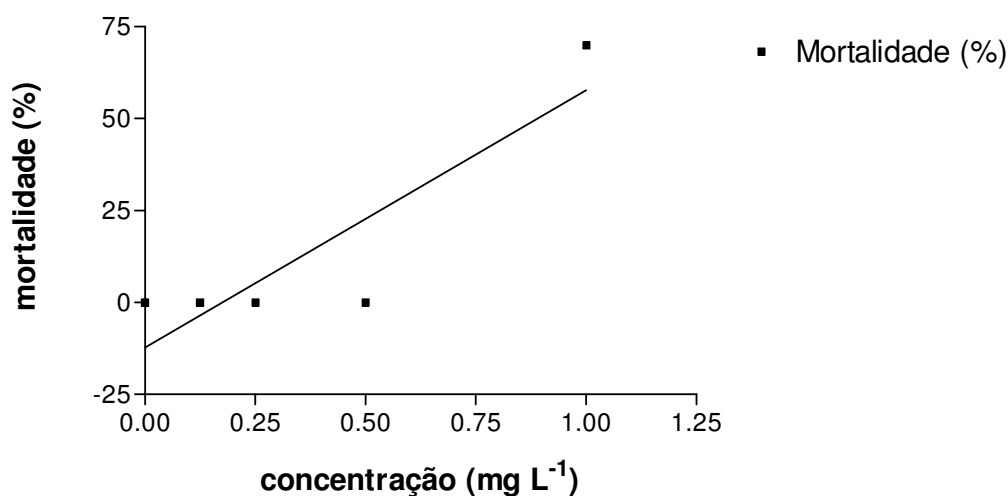
Os resultados de mortalidade para juvenis de tambaqui expostos a diferentes concentrações de triclorfon estão apresentadas na Tabela 4, onde a mortalidade foi observada apenas na concentração 1,00 mg L<sup>-1</sup> a partir de 48 horas de exposição até completar-se as 96 horas.

**Tabela 4** - Mortalidade (%) de juvenis de tambaquis nas diferentes concentrações de triclorfon durante a determinação da CL<sub>50-96h</sub>.

Tratamentos (mg L <sup>-1</sup> )	Mortalidade acumulativa (%) tempo em horas												
	24			48			72			96			Média
Repetições	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.00	0	0	0	0	0	60	50	0	40	20	40	-	70

Os sinais clínicos de intoxicação do tambaqui pelo inseticida foram observados após 48 horas de exposição, verificando movimentos natatórios erráticos e espasmos musculares nos animais submetidos às concentrações 0.50 e 1.00 mg L<sup>-1</sup>. Nas demais concentrações também observou-se movimentos natatórios erráticos no período de 72 horas após contaminação e espasmos musculares ao final do período experimental, exceto para concentração 0,125 mg L<sup>-1</sup>, que não apresentou espasmos musculares.

A concentração letal CL<sub>50-96h</sub> determinada no experimento para o *C. macropomum* foi de 0.82 mg L<sup>-1</sup>, com R<sup>2</sup> = 0.7813. A curva de regressão linear (95% de limite de confiança) estimada para a mortalidade dessa espécie está apresentada na Figura 6.



**Figura 6** - Curva de regressão linear estimada para a mortalidade de tambaqui, *C. macropomum*, exposto a diferentes concentrações de triclorfon.

### 5.3 – Parâmetros sanguíneos

A Tabela 5 mostra contagem de células vermelhas e a Tabela 6 as células denominadas células brancas (leucócitos). A Figura 7 caracteriza os diferentes tipos celulares sanguíneos que foram considerados no presente estudo.

#### 5.3.1 – Avaliação da série vermelha

O número de eritrócitos não diferenciou significativamente entre os grupos testados e o grupo controle, assim como os valores do hematócrito. Diferenças significativas também não foram observadas entre animais do grupo controle e grupos expostos ao triclofon para a taxa de hemoglobina (Tabela 5).

Os resultados de volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferenças significativas entre os animais do grupo controle e os expostos as concentrações subletais (Tabela 5).

**Tabela 5** - Valores médios  $\pm$  desvio (n=18) padrão das variáveis eritrocitárias em juvenis de *C. macropomum*, submetidos às concentrações (mg L<sup>-1</sup>) subletais de Triclofon<sup>(1)</sup>.

Parâmetro	Controle	0,125	0,25
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /μL)	2,03±0,33 a A	1,94±0,87 a	2,31±0,72 A
Hematócrito (%)	16,89±2,29 a A	15,56±3,88 a	17,17±4,58 A
Hemoglobina (g/dL)	7,77±1,07 a A	7,27±0,74 a	8,46±2,01 A
VCM (fL)	84,86±15,24 a A	101,64±67,68 a	78,70±25,93 A
HCM (pg)	39,65±10,18 a A	47,52±28,42 a	39,83±13,82 A
CHCM (g\ dL)	47,21±11,18 a A	49,73±14,64 a	52,29±17,15 A

<sup>(1)</sup> Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferença estatística significativa (P<0,05).

### 5.3.2 – Avaliação da série branca

Entre o grupo controle e o grupo exposto à concentração 0,125 mg L<sup>-1</sup> não foram observadas diferenças significativas para número total de leucócitos. Diferenças significativas foram observadas entre o grupo controle e o grupo de animais expostos a concentração 0,25 mg L<sup>-1</sup> com elevação no número total de leucócitos (Tabela 6).

O número total de linfócitos dos grupos expostos ao triclorfon foi significativamente diferente, com elevado aumento, em relação ao grupo controle (Tabela 6). Diferenças significativas no número de monócitos foi observada entre o grupo controle e o grupo exposto à concentração subletal 0,125 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 6).

Não foram verificadas diferenças significativas entre os animais do grupo controle e animais dos grupos expostos ao triclorfon para o número total de neutrófilos (Tabela 6).

Número total de trombócitos (Tabela 6) demonstrou um aumento significativo entre o grupo controle e o grupo exposto a concentração 0,25 mg L<sup>-1</sup> de triclorfon.

**Tabela 6** - Valores médios  $\pm$  desvio padrão das células sanguíneas (série branca) e trombócitos em juvenis de *C. macropomum*, submetidos às concentrações (mg L<sup>-1</sup>) subletais de triclorfon<sup>(1)</sup>.

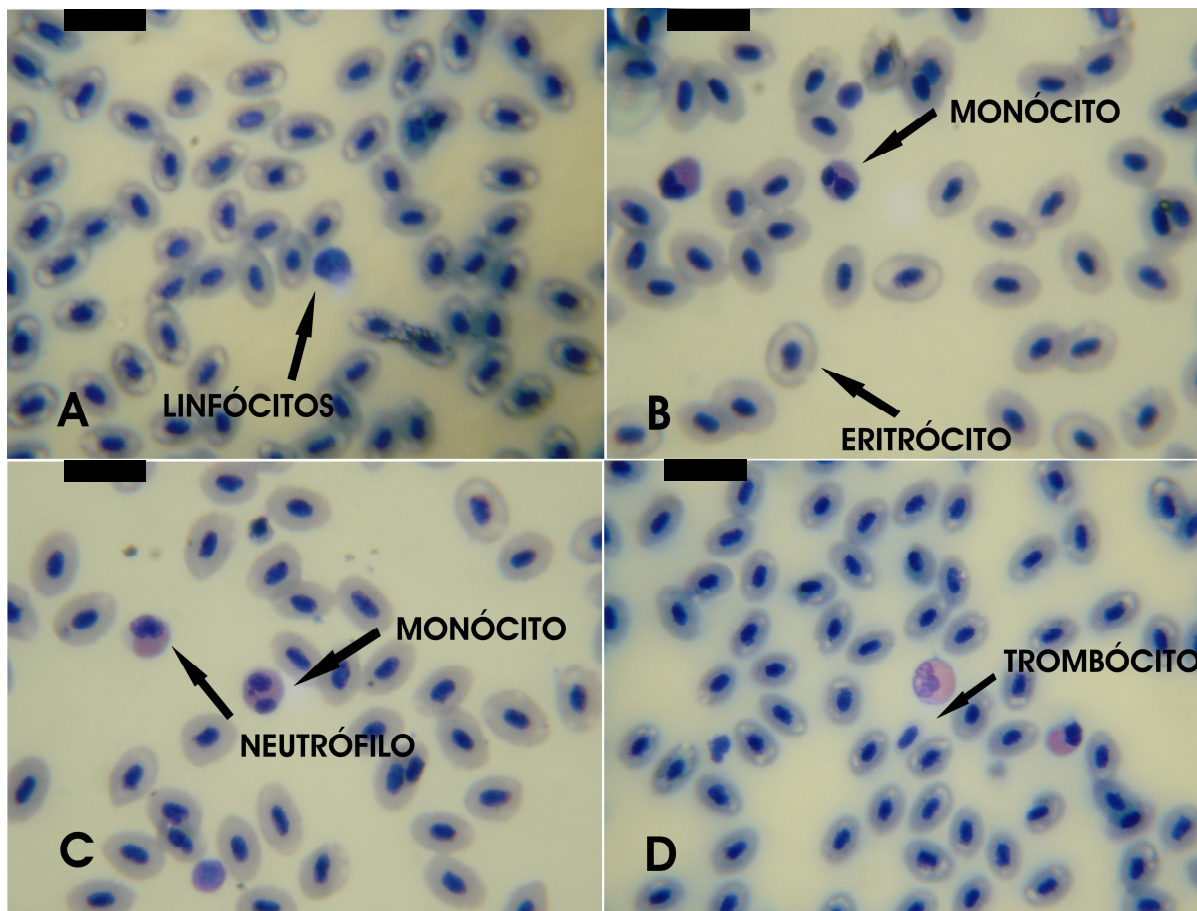
Parâmetro	Controle	0,125	0,25
<b>Nº total de Leucócitos (x 10<sup>3</sup>/µL)</b>	333,85 $\pm$ 55,16 a A	449,35 $\pm$ 268,81 a	537,73 $\pm$ 282,56 B *
<b>Linfócitos (n%/µL)</b>	99,30 $\pm$ 7,8 a A	222,99 $\pm$ 140,99 b*	254,22 $\pm$ 173,36 B**
<b>Monócitos (n%/µL)</b>	93,91 $\pm$ 44,48 a A	42,95 $\pm$ 48,34 b**	99,33 $\pm$ 67,63 A
<b>Neutrófilos (n%/µL)</b>	159,22 $\pm$ 46,71 a A	185,64 $\pm$ 128,80 a	201,36 $\pm$ 129,96 A
<b>Trombócitos (10<sup>3</sup> n%/µL)</b>	20,92 $\pm$ 8,4 a A	33,26 $\pm$ 20,86 a	53,34 $\pm$ 41,17 B *

<sup>(1)</sup> Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferença estatística significativa

(\*) p<0,05

(\*\*) p<0,01





**Figura 7** – Células de defesa orgânica (linfócitos, monócitos, neutrófilos e trombócitos) em tabaqui (*C. macropomum*), coloração Panótico, (barra 4µm) aumento: 1000x.

#### 5.4 – Frequência de micronúcleo (MNC%)

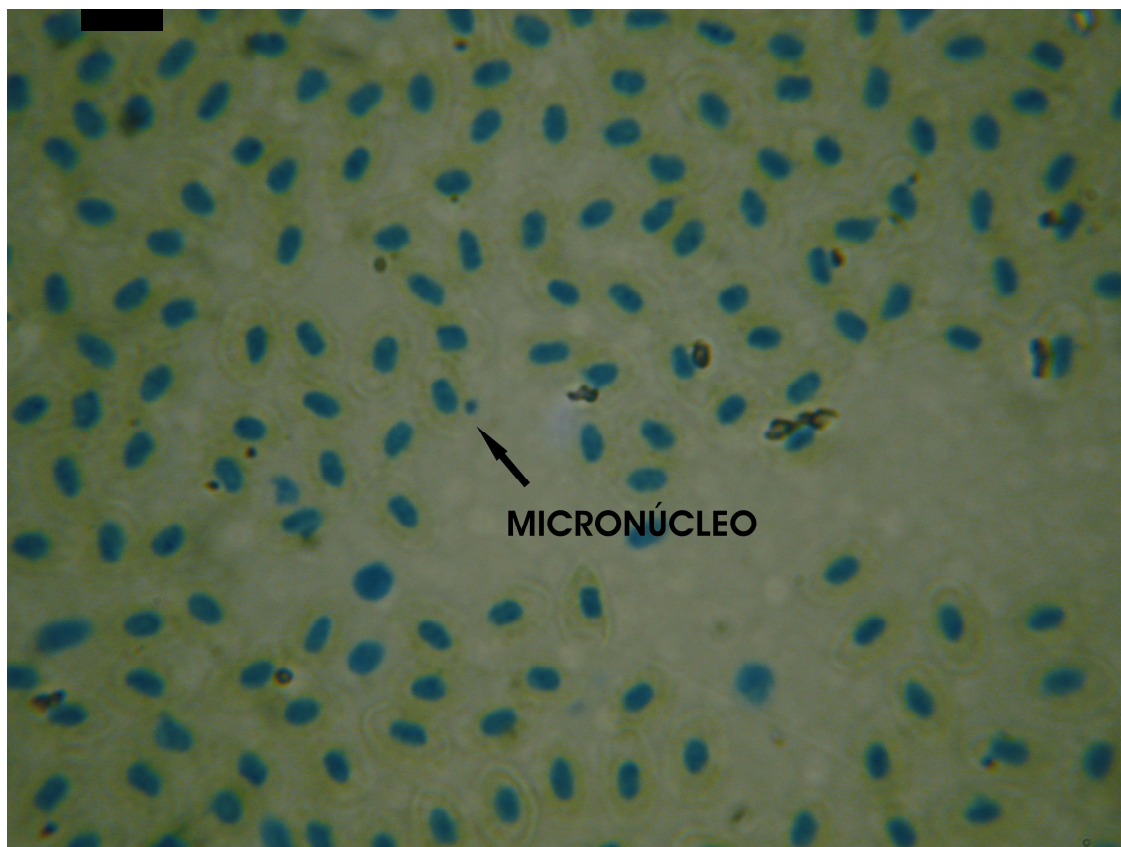
A frequência média micronúcleos em eritrócitos durante a exposição ao xenobiótico está descrita na Tabela 7. Diferenças significativas foram observadas entre o grupo controle e o grupo de animais expostos à concentração 0,125 mg L<sup>-1</sup> de triclofon. Os eritrócitos contendo micronúcleos encontram-se evidenciados na Figura 8.

**Tabela 7** – Valores (média  $\pm$  desvio padrão) de frequência de micronúcleo em eritrócitos de tambaqui (*C. macropomum*) expostos a concentrações (mg L<sup>-1</sup>) subletais de triclorfon<sup>(1)</sup>.

Parâmetro	Controle	0,125	0,25
Frequência de micronúcleo (MNC %)	9,67 $\pm$ 3,04 a A	18,23 $\pm$ 10,84 b*	12,8 $\pm$ 3,77 A

<sup>(1)</sup> Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferença estatística significativa

(\*) diferença significativa  $p < 0,05$ .



**Figura 8** – Eritrócitos de tambaqui (*C. macropomum*) contendo micronúcleo (barra 4 $\mu$ m), coloração Ginsey 5%, aumento 1000x.

## 6 – DISCUSSÃO

### 6.1 – Parâmetros de qualidade da água

A presença do triclorfon na água não causou alterações nos parâmetros de qualidade da água (Tabela 3) durante o período experimental, estando todos dentro dos níveis considerados ideais para o cultivo de peixes (BOYD, 1982).

### 6.2 – Concentração letal média - $CL_{50-96h}$

A toxicidade do triclorfon foi descrita por outros autores para vários organismos aquáticos. Na Tabela 8 encontram-se espécies de peixes submetidos a testes de toxicidade para o triclorfon.

**Tabela 8** – Toxicidade aguda ao triclorfon para espécies de peixes –  $CL_{50}$

<b>Espécie</b>	<b>Tempo de exposição</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Referência</b>
<i>Cyprinus carpio</i>	24 h	15,0	International Prog. on Chem. Safety, 1992
<i>Pimephales promelas</i>	96 h	51,0	International Prog. on Chem. Safety, 1992
<i>Cichlasoma urothalmus</i>	24 h	26,54	Flores-Nava & Vizcarra-Quiroz, 1988
<i>Piaractus Mesopotamicus</i>	96 h	0,1906	Mataqueiro, 2006
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	96 h	0,23	Lopes, 2005
<i>Prochilodus magdalenae</i>	96 h	0.495	Lozano <i>et al.</i> , 2003
<i>C. macropomum</i>	96h	0,82	Presente estudo

Os testes de toxicidade permitem o cálculo da  $CL_{50-96h}$ , que por sua vez, indica qual é a dose limite considerada letal (HEATH, 1995). A  $CL_{50-96h}$  encontrada para o tambaqui foi de  $0,82 \text{ mg L}^{-1}$ . Dados citados na literatura (Tabela 8) mostram uma variação da  $CL_{50-96h}$  triclofon que vai de  $0,1906 \text{ mg L}^{-1}$  para *Piaractus mesopotamicus* (MATAQUEIRO, 2006) a  $51,0 \text{ mg L}^{-1}$  para *P. promodelas* (INTERNATIONAL PROG. ON CHEM. SAFETY, 1992). No entanto, as espécies *P. promodelas*, *C. uruphthalmus* e *P. magdalenae* vivem sob condições ambientais (temperatura, alcalinidade, pH,) distintas das nativas da fauna brasileira. O valor obtido de  $CL_{50-96h}$  para tambaqui diferencia do pacu, demonstrando maior tolerância ao triclofon, ambos pertencentes à mesma família.

Os sinais clínicos nos animais expostos ao triclofon como movimentos natatórios erráticos e espasmos musculares, provavelmente podem estar relacionados com alterações nas transmissões sinápticas, como também evidenciou Rodrigues (1997) em curimatá (*Prochilodus scropha*) quando exposto ao xenobiótico, pois segundo Tomilin (1995), o triclofon causa inibição da enzima acetilcolinesterase. Outros organofosforados utilizados na piscicultura no controle de parasitoses também causam distúrbios comportamentais, como observado em alevinos e juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) quando expostos ao paration-metílico (MATAQUEIRO, 2002). Em carpas (*C. carpio*) expostas ao diazinon apresentaram agitação logo que entraram em contato com o produto (SVOBODA, 2001). Segundo Aguiar et al. (2004), organofosforados alteram a fisiologia dos peixes pela inibição da acetilcolinesterase, promovendo intensificação dos impulsos nervosos.

Para Who (1992) as concentrações máximas permitidas para tratamento de parasitoses em peixes está na faixa que vai de  $0,2$  a  $2,00 \text{ mg L}^{-1}$  de triclofon, já a resolução CONAMA n.20 (BRASIL, 1986) determina que a concentração limite de organofosforados em águas da classe 1 (destinadas à criação natural e ou intensiva de espécies destinadas a alimentação humana) é de  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ . Todas as concentrações letais médias citadas na literatura, inclusive a obtida no presente estudo, encontram-se acima da recomendação da legislação brasileira.

As taxas de mortalidade em *C. macropomum* demonstram que apenas os animais expostos a maior concentração ( $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) morreram ao longo do período experimental. Estes resultados confirmam que o tratamento na dosagem máxima de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  em banhos de longa duração, recomendada por Kubitzka & Kubitzka

(2004) não causam mortalidades em *C. macropomum*. De acordo com Alexandrino & Raia (1997) os tipos de tratamentos são classificados em: banho de longa duração (24 a 48 horas); banhos curtos (30 a 60 minutos); banhos de imersão (1 a 10 minutos).

Cuidados devem ser considerados quando se utiliza triclorfon no controle de parasitoses em outras espécies. Dados obtidos por Mataqueiro (2006) revelaram que na concentração de 0,34 mg L<sup>-1</sup> ocorreu mortalidade de 100% de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e 20% na menor concentração testada (0,07 mg L<sup>-1</sup>) ao final de 96 horas de exposição. Estes resultados sugerem maior sensibilidade do *P. mesopotamicus* em relação ao *C. macropomum*. As respostas diferenciadas entre as espécies podem ter ocorrido em função das condições ambientais as quais foram realizados os estudos.

A variação na sensibilidade pode estar associada às condições experimentais, pois os organofosforados inicialmente sofrem transformações estruturais para exercerem sua ação tóxica (HIRATA et al., 2003). A presença de diclorvós que é um metabólito resultante do processo de desidrocloração do triclorfon apresenta maior ação tóxica (BARTHEL et al., 1955). Este processo é influenciado pelo pH do meio. Resultados obtidos por Metcalf et al., (1959) confirmaram que a desidrocloração do triclorfon é desprezível a pH 5,4, atingindo, porém, a taxa de 60% após 2 horas a pH 8,0. Estudos realizados por Hirata et al. (2003), confirmaram a ação mais tóxica do triclorfon em águas com pH alcalino.

Durante o período experimental, o pH da água utilizada no bioensaio manteve-se próxima da neutralidade, faixa na qual, é indicada para o cultivo de peixes, porém causa alteração ao produto, formando seu metabólito mais tóxico, o diclorvós (DEDEK, 1979). Devemos ainda considerar que a incidência de raios ultravioleta favorece a degradação do triclorfon em diclorvós e outros dois produtos desconhecidos (GIOVANOLI-JAKUBCZAK et al., 1971).

Produtos empregados no controle de parasitoses que apresentem alta toxicidade aos peixes devem ser substituídos por outros menos tóxicos, na tentativa de diminuir o impacto nos peixes e ao ambiente. A exposição ao paration metílico para alevinos e juvenis de *P. mesopotamicus*, realizada por CRUZ et al. (2004) obtiveram concentração letal média, respectivamente, em 3.97 mg L<sup>-1</sup> e 9.89 mg L<sup>-1</sup>. Estes resultados demonstram que a ação variada do xenobiótico dependendo do estágio de desenvolvimento e das condições ambientais as quais estão submetidos

os animais. *C. carpio* exposto ao diazinon, a concentração letal média foi estimada em 16,0 mg L<sup>-1</sup> (SVOBODÁ, 2001). Segundo Tomita & Beyruth, (2002) a toxicidade de um composto químico depende da exposição, da suscetibilidade do organismo, das características químicas do agente e de fatores ambientais.

De acordo com a classificação proposta por Guimarães (1996) para avaliação da periculosidade dos agrotóxicos para peixes, os agrotóxicos são classificados em classes, variando de I a IV, e esta classificação baseia-se nos valores de CL<sub>50</sub> obtidos experimentalmente. O resultado da toxicidade aguda ao triclorfon em tambaqui o enquadra na classe II (CL<sub>50</sub> - 0,1 a 10 ppm), considerado muito perigoso para organismos aquáticos. Este resultado também confirma a classificação proposta pela ficha de informação de segurança de produto químico, como produto muito perigoso para organismos aquáticos (MSDS BAG, 2004).

### **6.3 – Efeitos nos parâmetros hematológicos: série vermelha**

O sangue é um dos maiores órgãos do corpo, formando cerca de 7% do total do peso corporal. O sangue pode ser dividido em três elementos celulares – eritrócitos, leucócitos e trombócitos. A hematologia é uma parte essencial da toxicologia onde todas as ciências podem ser integradas e avaliadas para determinar os riscos para saúde animal e para o ambiente (EVANS, 2008).

Eritrócitos são as células mais numerosas do sangue e sua função principal é o transporte de gases, papel desempenhado pela hemoglobina. Reduções desses parâmetros são indicativos de anemias (VOSYLIENÉ, 1999; TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). O desequilíbrio osmorregulatório também altera estes parâmetros causando hemoconcentração ou hemodiluição (PIMPÃO, 2006). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as concentrações utilizadas de triclorfon não foram capazes de alterar os parâmetros hematológicos e que provavelmente essas concentrações não interferiram nas funções dos tecidos hematopoiéticos (rim cefálico e o baço).

O tratamento de parasitoses em peixes é um problema enfrentado pelos piscicultores, pois os produtos usualmente aplicados no controle são tóxicos para os peixes e ao meio ambiente (CHAGAS et al., 2006). No presente estudo não foram observadas alterações na série vermelha do tambaqui. Entretanto, após exposição



ao triclorfon ( $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) em *Piractus mesopotamicus*, ocorreu redução número de eritrócitos e taxa de hemoglobina (TAVARES DIAS et al., 1999b). Em *Cyprinus carpio* (RANZANI-PAIVA, 1987) e *Oreochromis mossambicus* (SAMPATH et al., 1993) expostos ao xenobiótico aumentaram o número de eritrócitos e taxa de hemoglobina. As alterações descritas em peixes após exposição ao triclorfon revelam que diferentes espécies respondem de forma diferenciada sob condições ambientais e concentrações utilizadas.

Outros organofosforados empregados no controle de parasitas em peixes quando submetidos por períodos superiores a 96 horas causaram alterações nos parâmetros hematológicos. Mataqueiro (2002) verificou aumento no número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e redução no volume corpuscular médio em *P. mesopotamicus*, após a exposição (8 dias) ao paration-metílico. John (2007) verificou aumento na taxa de hemoglobina, hematócrito e contagem de hemoglobina em *Mystus vittatus* quando exposta ao metasystox ( $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) pelo período de 30 dias.

No controle de parasitoses, os organofosforados são recomendados, porém estes têm alto grau de toxicidade para peixes, ambiente e aplicador, e alternativas devem ser investigadas (POST, 1987; NOGA, 1996). Outros agrotóxicos foram testados quanto seu grau de toxidez no meio aquático. Porto (2005) verificou não haver diferenças significativas nos parâmetros hematológicos de *C. macropomum* exposto em diferentes tempos (24 e 48 h) ao glifosato Roundup na concentração  $48,35 \text{ mg L}^{-1}$ . John (2007) avaliou os efeitos do Sevin, um carbamato, em *Mystus vittatus* expostos em concentração subletal ( $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante 30 dias e observou aumento na taxa de hemoglobina, contagem de células vermelhas e hematócrito. Chagas et al., (2006) observaram alterações nas variáveis hematológicas, em tambaqui (*C. macropomum*) expostos a mebendazol, fármaco anti-helmintico que pertence aos derivados benzimidazólicos, na concentração  $300 \text{ mg L}^{-1}$  após 120 minutos de exposição, com aumento na taxa de hemoglobina.

Os índices hematimétricos em *C. macropomum* (VCM, HCM e CHCM) não sofreram alterações após exposição ao triclorfon. Segundo McCarthy et al. (1973), os valores de VCM e HCM não são bons indicadores e devem ser interpretados com mais cautela para peixes, já que são calculados a partir da contagem total de eritrócitos e pode apresentar margens de erro, sendo o CHCM mais indicado por ser calculado a partir do percentual de hematócrito e da hemoglobina.

## 6.4 – Efeitos nos parâmetros hematológicos: série branca

Leucócitos são células do sistema imune, sendo prontamente recrutadas pelo organismo contra a invasão de patógenos, toxinas, lesões ou danos ambientais que perturbem a homeostasia (BROWN, 1997). O perfil leucocitário é particularmente avaliado porque estes são alterados por estresse e podem ser diretamente relacionados com hormônios do estresse, onde as principais mudanças causadas pelo estresse ou tratamento com glicocorticóides aumentam o número de neutrófilos e reduções no número de linfócitos. (DAVIS et al., 2004).

O fator biológico mais importante na interpretação das análises das células brancas é a variação em tipo, número e aparência dos leucócitos (BARTON & IWAMA, 1991), no entanto, a caracterização de células brancas em peixes é dificultada devido à falta de padronização das características das células leucocitárias e segundo Afonso et al., (1998) e Vale et al., (2002) é difícil distinguir e quantificar a população leucocitária usando critérios simples de morfologia, sendo necessário a utilização de técnicas citoquímicas.

Outro ponto relevante é quanto à metodologia empregada na quantificação de leucócitos, pois, segundo Tavares-dias & Moraes (2004) a diversidade de técnicas para quantificação e identificação dos leucócitos é responsável pela dificuldade da comparação dos estudos. Resultados obtidos por Ishikawa et al., (2008) demonstram diferenças na quantificação total de leucócitos em peixes pela técnica de contagem direta e indireta.

### 6.4.1 – Leucócitos

A elevação significativa ( $p < 0,05$ ) do número total de leucócitos evidencia que houve recrutamento de células relacionadas com o sistema de defesa orgânica do tambaqui (*C. macropomum*). Este aumento é comumente observado como reação durante os primeiros dias de exposição ao estresse quando os peixes tentam restaurar a homeostasia, no entanto, persistindo o fator estressante, decréscimos são observados, demonstrando debilidade do sistema imune (VOSYLIENÉ, 1999).

Leucocitose também foi evidenciada em *Mystus vittatus* exposto ao organofosforado Metasystox por 30 dias em concentração subletal ( $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) (JOHN, 2007). No entanto, leucopenia foi observado em carpa (*C. carpio*) em



contato com diazinon ( $19,48 \text{ mg L}^{-1}$ ) pelo período de 96 horas (SVOBODA et al., 2001). Já o organofosforado metion-paration não causou alterações significativas em pacu (*P. mesopotamicus*) para os diferentes tempos de exposição (3 e 8 dias) em concentração subletal (MATAQUEIRO, 2002).

Resultado semelhante ao encontrado no presente estudo foi observado por Pimpão (2006), onde leucocitose ocorreu em *Ancistrus multispinis* exposto ao piretróide, deltametrina ( $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ). Estudos com 243 pesticidas consideraram os piretróides como um dos mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como peixes e crustáceos (WHO, 1990). Já o carbamato Sevin, não causou alterações significativas em *M. vittatus* na concentração  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  pelo período de 30 dias de exposição (JOHN, 2007), provavelmente, sendo menos tóxico em relação ao triclorfon.

#### 6.4.2 – Linfócitos

Os linfócitos participam de processos inflamatórios, porém suas funções em peixes não estão bem esclarecidas, sendo necessário estudo de sua composição química (LAMAS et al., 1994). Segundo Campebell (1996) linfócitos estão envolvidos numa variedade de funções imunológicas como produção de imunoglobulina e modulação do sistema de defesa. Em *C. macropomum* em concentrações subletais, o triclorfon induziu linfocitose, sendo essa uma resposta de preparação ao organismo para possíveis patogenias. Linfopenia, no entanto, foi observado por Siwicki et al., (1990), em carpas (*C. carpio*) após intoxicação com triclorfon.

Outras espécies expostas a organofosforados produziram linfopenia, como em *C. carpio* (SVOBODÁ et al., 2001) exposta ao diazinon e em *H. fossilis* exposto ao paration-meílico (NATH & BANERJEE, 1996). Já em *P. mesopotamicus*, não foram observadas alterações após exposição ao paration-metílico (MATAQUEIRO, 2002), bem como, Thuvander et al., (2002) estudando trutas arco-íris exposta ao Clophen A50. Entre as alterações leucocitárias, a mais comum é a redução do percentual ou número de linfócitos circulantes, possivelmente em decorrência de sua redistribuição entre os órgãos linfopoiéticos ou do tráfego desses leucócitos (TAVARES & MORAES, 2004).

### 6.4.3 – Monócitos

Redução no valor de monócito foi observado no grupo exposto ao triclorfon para concentração 0,125 mg L<sup>-1</sup>. Monócitos são células de longa vida e são associados à defesa contra infecções bacterianas (Campebell 1995, Davis, Cook & Altizer 2004). Este resultado aponta para maiores cuidados em relação à utilização do triclorfon em animais com elevado grau de infestação parasitária, principalmente, quando esses são do gênero *Argulus* e *Dolops*, pois comprovou-se que estas parasitas são responsáveis por transportar viroses e bacterioses de importância na piscicultura (Pavanelli et al., 2002).

Alguns autores relatam a dificuldade em diferenciar leucócitos em peixes, como citado por PIMPÃO (2006). Os monócitos foram caracterizados como uma célula arredondada, com citoplasma basófilo, vacuolizado, núcleo em geral excêntrico ou esférico e são consideradas verdadeiras células em trânsito no sangue periférico (LORENZI, 1999; TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

### 6.4.4 – Neutrófilos

Neutrófilos são os primeiros leucócitos fagocitários a proliferarem na circulação em resposta a infecções, inflamações e estresse (JAIN, 1993; CAMPEBELL, 1995; RUPLEY, 1997; HARMON, 1998; THRALL, 2004). O Aumento na contagem de neutrófilos pode ocorrer devido à liberação de glicocorticóides que estimulam o influxo de neutrófilos no sangue pela medula óssea e atenua o egresso de neutrófilos do sangue para outros compartimentos (BISHOP et al., 2006). Estes resultados sugerem que, provavelmente a exposição ao triclorfon não induziu a liberação de glicocorticóides. O número de neutrófilos sob exposição ao pesticida paration-metílico em pacu (*P. mesopotamicus*) também não causou alterações significativas (MATAQUEIRO, 2002). Esta resposta também foi observada em *C. carpio* exposta ao diazinon (SVOBODÁ, 2001).

#### 6.4.5 – Trombócitos

Os trombócitos se equivalem às plaquetas nos mamíferos e tem sido incluído na contagem diferencial em peixes o que trás dificuldade na comparação de modernas contagens que não incluem trombócitos na contagem diferencial (THRALL, 2004). A função fagocitária dos trombócitos ainda não foi completamente elucidada, onde existem controvérsias entre autores quanto sua participação nos mecanismos de defesa (TAVARES-DIAS et al., 2007). Alguns autores têm reportado a habilidade fagocitária em teleósteos, porém Meseguer et al., (2002) questiona devido a falta de evidencias da digestão em trombócitos.

Algumas estruturas ligadas ao mecanismo fagocitário foram identificadas em trombócitos de tambaqui (*C. macropomum*), evidenciando uma possível participação destas células como agentes de defesa do organismo, no entanto o autor sugere mais estudos a fim de confirmar a função de defesa dos trombócitos em peixes (TAVARES-DIAS et al., 2007).

*L. macrocephalus* e *P. mesopotamicus* infestados por parasitas não apresentaram alterações nos contagens de trombócitos (TAVARES-DIAS et al., 1999), resultado semelhante foi encontrado por Tavares-Dias et al. (1998) em *O. niloticus* infestada por *I. multifilis* e *Saprolegnia* sp., possivelmente pelo equilíbrio entre a relação parasita/hospedeiro. Em *P. mesopotamicus* infestados por *Argulus* sp redução do percentual de trombócitos foi observado, possivelmente estivessem sendo mobilizados para contribuir nos mecanismos de defesa orgânica (TAVARES-DIAS et al., 1998).

Diante das proposições dos referidos autores citados acima, pode-se inferir que os aumentos na contagem de trombócitos no presente estudo, possivelmente podem ter sido causadas pela alteração do sistema imune, pela presença do xenobiótico. No entanto, estas células devem ser incluídas num bloco de células denominado como células sanguíneas de defesa orgânica (TAVARES-DIAS et al., 1998).

## 6.5 – Frequência de micronúcleos (MNC%)

O teste do MNC% foi utilizado neste trabalho como mecanismo de avaliação de possíveis danos celulares, causados pela exposição ao triclorfon. Segundo Heddle et al. (1991), micronúcleos são respostas a curto prazo a uma substância genotóxica, de modo que a sua expressão depende da intensidade da exposição à poluição e provavelmente independente da duração de tal exposição. No entanto, no presente estudo a exposição à maior concentração (0,25 mg L<sup>-1</sup>) não foi capaz de causar alterações significativas.

De Flora et al. (1993) relatam que alterações cromossômicas são mais evidentes após sete dias da exposição a agentes mutagênicos e não há um incremento após quinze e trinta dias, o que é típico de marcadores biológicos porque células danificadas tendem a ser removidas do organismo mais rapidamente do que células jovens. Assim, podemos inferir que, possivelmente, a exposição à concentração 0,25 mg L<sup>-1</sup> de triclorfon, em *C. macropomum*, induziu maior atividade repositória de células danificadas, já que nessa concentração não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle. Este resultado também pode estar associado à paralisação do processo de eritropoiese. Segundo Udriou (2006) agentes genotóxicos resultam na paralisação desse processo, portanto, não somente a produção de eritrócitos é interrompida, mas também a de micronúcleos, resultando em um falso negativo.

Diversos estudos relatam que determinadas espécies não são adequadas para estudos de biomonitoramento, pois não respondem à presença de contaminantes no ambiente aquático, enquanto que outras espécies são capazes de detectar a presença destes (RAMSDORF, 2007). A elevação significativa na frequência de micronúcleo na concentração subletal 0,125 mg L<sup>-1</sup>, obtido no presente trabalho revela a adequação do tambaqui como organismo sensível a poluição ambiental por triclorfon. Outras espécies também foram utilizadas no estudo de biomonitoramento. Ayllon & Garcia-vazquez (2000) verificaram a sensibilidade da espécie *Poecilia latipinna* ao cádmio e ao mercúrio e falta de sensibilidade de *P. phoxinus* ao mercúrio. Grisolia & Cordeiro (2000), ao trabalharem em bioensaios com ciclofosfamida e mitomicina no teste do micronúcleo pisco, verificaram que a espécie *Tilapia rendalli* apresenta maior sensibilidade do que as espécies *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio*. LEMOS et al. (2005), analisando

diferenças de resposta entre espécies em análises *in situ*, também observaram a adequação da espécie *Tilapia rendalli* como bioindicadora de genotoxicidade em ambiente lacustre.

Aumento na frequência de micronúcleo também foi verificada por Moron et al. (2006) em *Piaractus mesopotamicus* quando exposto ao herbicida atrazina. Resultado semelhante foi observado por Ayllon & Garcia-Vazquez (2001) em *Oncorhynchus mykiss* quando expostos a ciclofosfamida, N-etil-N-nitrosuera, acrilamida e colchicina. No entanto, Moreira-Neto et al. (2008) não observaram diferenças significativas nos resultados obtidos pelo teste de Micronúcleo em *Poecilia reticulata* entre o grupo tratado com cipermetrina (piretróide) e o controle para tratamentos de curta (96h) e longa duração (28 dias).

Segundo Gustavino et al. (2001), há uma variação no número de micronúcleo nas células de peixes e alguns trabalhos relatam diferenças naturais no número de micronúcleo em algumas espécies. De acordo com Al-Sabti & Metcalf (1995) a frequência de MNC% depende da cinética da proliferação celular, sendo está variável em função da espécie de peixe, tecido estudado e com alterações ambientais. Embora alguns autores mencionem variações no modelo, o teste do micronúcleo em peixes pode representar uma alternativa para detecção da genotoxicidade (Hose et al., 1987; Ayllon & Garcia-Vazquez, 2000).

## 7- CONCLUSÕES

- A concentração letal média obtida para tambaqui (*C. macropomum*) exposto ao triclorfon é 0,82 mg L<sup>-1</sup>;
- O triclorfon não causou alterações nos parâmetros hematológicos: série vermelha em *C. macropomum* em concentrações subletais, pelo período de 96 horas;
- O triclorfon promove alterações leucocitárias em *C. macropomum* em concentrações subletais, no período de 96 horas de exposição, com elevação na quantidade de linfócitos e redução na quantidade de monócitos;
- O uso de triclorfon em *C. macropomum* com elevado grau de infestação parasitária, por ectoparasitas do gênero *Argulus* e *Dolops* pode favorecer infecções bacterianas;
- O triclorfon provoca elevação na frequência de micronúcleo nos eritrócitos do *C. macropomum*, na concentração subletal.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A.E.; SILVA, M.T. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). A light and electron microscopic cytochemical study. **Dis. Aquat. Org.** v. 34, p. 27-37, 1998.
- AGUIAR, L.H; MORAES, G.A.I.M.; ALTRAN, A.E.; CORREA, C.F. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus* **Environmental Research, California**, v. 95, p. 224-230, 2004.
- AL-SABTI, K.; METACALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity **water. Mut. Res.**, n.323, p. 121-135, 1995.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in european minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutat. Res.**, n.467, p.177-186, 2000.
- \_\_\_\_\_; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 221-225, 2001.
- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição dos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. São Paulo, V.6, n.4, p.26-31, out. 2003.
- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prática de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 5 ed. São Paulo:Editora, 1996. 506p.
- AROUCO, L.R.R., **Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de daphnias em presença e ausência de sedimento**. 2002. 86p. Dissertação (mestrado em aquicultura de águas continentais) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal-SP, 2002.
- AZEVEDO, Fausto Antonio de; CHASIN, Alice da Matta. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos: RiMa, 2003. 340p.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.
- BARROS, M.; SILVA, M.; SOSA, R. Geo-Goiás - 2002. Disponível em: [http://www.agenciaambiental.go.gov.br/geogoiás/indice\\_inicial.php](http://www.agenciaambiental.go.gov.br/geogoiás/indice_inicial.php)>. Acesso em: 24 abr. 2007.
- BARTHEL W.F.; ALEXANDER B.H.; GIANG P.A.; HALL S.A. 1955. Insecticidal phosphates obtained by a new rearrangement reaction. **J. Am. Chem. Soc.** v.77, p.2424–2427, 1955.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Rev. Fish Dis.** v. 1, p. 3-26, 1991

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* L. during Dimethoate exposure. **Food and Chemical Toxicology**, Oxon, v. 33, n. 5, p. 423-426, 1995.

BELPAEME, K.; DELBEKE, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. n.11, p. 485-492, 1996.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Ciência e Cultura**, v. 42, n. 3/4, p 271-7. 1990.

BISHOP, C.R., ATHENS, J.W., BOGGS, D.R., WARNER, H.R., CARTWRIG, G.; BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A.; Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. v.36(3), p.357-364, 2006.

BORSOI, Z.M.F.; TORRES, S.D.A. **A Política de Recursos Hídricos no Brasil**. SP: BNDES, 1997, 112p.

BOYD, C.E. Water quality management for pond fish culture. Amsterdam: **Elsevier Publishing Company**, 1982. 318p.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Portaria n.20, de 30 de julho de 1986. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 1986.

BRIDGES, D. W.; CECH, J. J.; PEDRO D. N. Seasonal haematological changes in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. **Transactions of American Fisheries Society**. v.5, p.596–600, 1976.

BROWM, E.J. Adhesive interaction in the immune system. **Cell Biol.**, v. 7, p. 289-295, 1997.

BURATINI, S.V. Biodegradação In ZAGATO, P. A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, p. 89 - 116.

\_\_\_\_\_; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In ZAGATO, P. A. & BERTOLETTI, E.; **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, p. 55 -88.

BÜCKER, A.; CONCEIÇÃO, M.B. Avaliação da genotoxicidade por frequência de Micronúcleos em eritrócitos de tilápias expostas às águas do Rio Itajaí-Açú e Itajaí-Mirim, Santa Catarina-Brasil. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA. Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia – SETAC Brasil. Florianópolis, SC. Vol.2. Livro de Resumos. p 109-110. 2004.



CAMPBELL, T.W. (1995) **Avian Hematology and Cytology**. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1995,

\_\_\_\_\_. **Clinical pathology. Reptile Medicine and Surgery** ed. MADER, D.R. (ed). W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA. 1996, p. 248–257.

CHAPMAN, P.M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine pollution Bulletin**, Pergamon, n.44, p.7-15, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em : agosto de 2007.

CAZENAVE, J. ;WUNDERLIN, D.A.; HUED, A.C. Haematological parameters in a neotropical fish, *Corydora paleatus* (Jenyns, 1842), captured from pristine and polluted water. **Hydrobiologia**, n.537, p. 25-33, 2005.

CECCARELLI, P. S.; FIGUEIRA, L. B.; FERRAZ DE LIMA, C. L. B.; OLIVEIRA, C. Observações sobre a ocorrência de parasitos no CEPTA entre 1983 e 1990. **Bol. Técn. do CEPTA**, Pirassununga, v.3, p.43-54, 1990.

CHAGAS, L. P.; JOYEUX, J.C.; FONSECA, F.R. Small-scale spatial changes in estuarine fish: Subtidal assemblages in **tropical Brazil**. **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v.8, p.861 – 875, 2006.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Ass.** n.50, p.550-552, 1944.

CRUZ, C.; MENEZES, M. L.; MACHADO NETO, J. G. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Pesticidas: **R.Ecotoxicol. e meio Ambiente**, Curitiba - Paraná, v.14, p. 93-102, jan/dez 2004.

Da SILVA, J.; HERRMANN, S.M.; HEUSER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**. n.40, p.941-947, 2002.

DAVIS, A.K.; COOK, K.C.; ALTIZER, S. Leukocyte profiles of House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. **Ecohealth**, v.1, p.362–373, 2004.

DEDEK, W.; GEORGI, W.; GRAHL, R. Comparative degradation and metabolism of 32p labeled butonate, trichlorofon in dichlorvos in crop plants. **Biochem. Physiol.** v.174, p. 707-722, 1971.

De FLORA, S.; VIGANO, L.; AGOSTINI, F. D.; CAMOIRANO, A.; BAGNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. **Mutation Research**, n.319, p.167-177, 1993.

DHEER, J.M.S.; DHEER, T.R.; MAHAJAN, C.L. Haematological and haematopoietic responses to acid stress in an air-breathing freshwater fish. *Channa punctatus* Bloch. **Journal Fish Biology**. v. 30, p 577-588, 1987.

DITTMAR, É. Associação entre o desenvolvimento gonadal com a frequência de micronúcleos e de núcleos morfológicamente alterados em eritrócitos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) capturados no rio Aquidauana-MS-Brasil. 2005, 34p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2005.

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

FLORES-NAVA, A.; VIZCARRA-QUIROZ, J.J. Acute toxicity of trichlorfon (Dipterex) to fry of *Cichasoma urophthalmus* Gunther. **Aquaculture and Fisheries Management**. Inglaterra, v.19, p. 341-345, 1988.

FRANÇA, J.G.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; CARVALHO, S.; SERIANI, R. Toxicidade crônica do cloreto de mercúrio associado ao selênio, por meio do estudo hematológico em tilápia *Oreochromis niloticus*. **Bioikos**, Campinas, v. 21, p. 11-19, 2007

GARÁDI, P.; DOMARCO, R.C.; ARAUJO, O.J.; PINHEIRO, C.W.L. Avaliação do uso de inseticida (orgânicos fosforados) no combate às Odonatas e na seleção zoológica planctônica em piscicultura de alevinagem. CODEVASF. **Estudos de piscicultura**. Brasília, 1988, p.71.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune: Tropical Fish Hobbyist, 1977. 672 p.

GIOVANOLI-JAKUBZAK, T.; FITAK, B.; CHODKOWSKI, J. Photolysis of Dipterex and DDVP under the influence of UV irradiation. **Rocz. Chem.**, v.45, p. 689-694, 1971.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Amer. J. Clin. Path**, v.56, p. 35-39, 1971

GUIMARÃES, G.L. Toxicologia e meio ambiente e legislação específica. In: AREAS. **Curso de proteção de plantas**. Brasília, 1996. p.1-41.

GUSTAVINO, B., SCORNAJENGHI, K. A., MINISSI, S. & CICCOTTI, E., 2001, Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-ray and colchicines. *Mutat. Res.*, 494: 151-159.

GRADVOHL, S.T.S. **Avaliação dos Riscos Ambientais e Ecotoxicológicos do Reuso de Águas Residuárias em Piscicultura**. 2006. 164 p. Dissertação (Mestre em Saneamento ambiental) CE.Fortaleza – UFCE, Fortaleza, 2006.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 235-239, 2000.

HACON, S. S. Avaliação e gestão do risco ecotoxicológico à saúde humana. In AZEVEDO, F.A; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003.p.245 - 322.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, Washington, v.11, n. 7, p.714 – 719, 1977.

HARMON, B.G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. **Poultry Science**, n.77, p. 972–977. 1998.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y.F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assays systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, v. 399 (2), p. 125-133, 1998.

HE, J.L.; CHEN, W.L.; JIN, L.F.; JIN, H.Y. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. **Mutation Research**. n.469, p. 223-231, 2000.

HEATH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**. C.R.C. Press, 1987.

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

HIRATA, R., SKORTZARU, B., NARCISO, E.S. Avaliação da degradação de inseticidas, em função do pH utilizando *Drosophila melanogaster* e teste de inibição enzimática. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.3, p.359-365, jul.\set., 2003.

HONDA, E.M.S. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas – II: alimentação de tambaqui, *Colossoma bidens* (Spix). **Acta Amazonica**, Manaus, v.4, p.47-53, 1974.

HOSE, J.E.; CROSS, J.N.; SMITH, S.G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off southern California. **Marine Environmental Research**, v.22, p.167-176, 1987.

INTERNACIONAL PROGRAME ON CHEMICAL SAFETY. **Trichlorfon (EHC 132, 1992)** 95p. Disponível em: < www. Who. Int/das/ cat. 97/ zehc 2. htm.# no 132: Trichlorfon>. Acesso em: 12 jan. 2008.

JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: **Blackwell Publishing**, 1993.

JOHN, P.J. Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to Metasystox and Sevin. **Fish Physiol. Biochem**, n.33, p.15-20, 2007.

JUAREZ, L.M.; ROUSE, D.B. Acute toxicity of trichorfon to juvenile freshwater prawn. **Progressive Fish-Culturist**. v.45, n.4, p.214-216, 1983.

KUBITZA, F.; KUBITZA L.M.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**, 3. ed. Piracicaba: Degaspari, 1998, 54p.

\_\_\_\_\_; KUBITZA, L.M.M. **Principais doenças e parasitoses dos peixes cultivados**. 4° Ed. 2004.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D.W.; TORANZO, A. E.; ANADÓN, R. Nonespecific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **J. Fish Biol.**, v.45, p.839-854, 1994.

LEMOS, N.G.; DIAS, A.L.; SILVA-SOUZA, A.T.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, p. 197-201, 2005.

LLORENTE, M.T.; MARTOS, A.; CASTANO, A. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.11, n. 1, p. 27-34, 2002.

LORENZI, T.F. **Manual de propedêutica e clínica**. São Paulo, MDSI. 1999, 641p

LOPES, R. B. **Análise ecotoxicológica dos xenobióticos triclorfon e diflubenzuron empregados na aquicultura continental**. 2005. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005

Lozano, G.S.; Pérez, S.S.; Vallesco, A. Determinación de La concentración letal media (CL50) Del triclorfon em alevinos de bocachico (*prochilodus magdalenae*, steindeachner, 1878). **MVZ-Córdoba**, v.8, n.1, p.283-289, 2003.

MAGALHÃES, T. Perigo de morte (ou risco de vida). **Revista Biologia**. v.7,n.7, p.4-9, agosto 1995.

McCarthy, D.H.; Stevenson, J.P.; Roberts, M.S. Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **J. Fish Biol.**, v.5 p.1-8, 1973.

MCCORMICK, S.D., NAIMAN, R.J. Hypoosmoregulation in an anadromus teleost: influence of sex and maturation. **J. Exp. Zool.**, v.234, p.193-198, 1985.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A. & PIMENTA, J.A. (eds), **Bacia do Rio Tibagi**. Londrina: RIMA, 2002, p.124- 150.

MATAQUEIRO, M.I. Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl paration no pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887). 2002. 41p. Dissertação (mestrado em aquicultura de águas continentais) – Centro de Aquicultura da

Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal-SP, 2002.

\_\_\_\_\_. Toxicidade aguda do triclorfon em pacu juvenis (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). 2006. 59p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal-SP, 2006.

MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.; MCKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; McCUME, D. C.; RATTNER, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, cap. 4, p. 155 –196.

MELO, J.F.B., TAVARES-DIAS, M., LUNDESTEDT, L.M., MORAES, G. Efeito do conteúdo de proteína na dieta sobre os parâmetros Hematológicos e metabólicos do bagre sul americano *Rhamdia quelen*. **Revista Ciência Agroambiental**, v.1, n.1, 2006.

MESEGUER, J.; ANGELES ESTEBAN, M.; RODRÍGUEZ, A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes. **Microsc. Res. Tech.** n.57, p.491-497, 2002.

METCALF, R.L.; FUKUTO, T.R.; MARCH, R.B.. Toxic action of Dipterex and DDVP to the housefly. **J. Econ. Entomol.** v.52, p. 44-49, 1959.

\_\_\_\_\_; EDDY. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4<sup>ed</sup>. New York: McGraw-Hill. 2003. 1820p

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay or the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**. v.367, n.58, p.245-251, dez. 1996.

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. 2006. 166 p. Dissertação (Mestre em Biologia celular e molecular) – UFPR, Curitiba, 2006.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.J. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v.36, n.3, p.370-374, fev. 2002.

MOREIRA-NETO, J.F.; PEREIRA, B.B.; FARIA, R.C.B.; LUIZ, D.P.; DE CAMPOS J.R.; VALVERDE, B.T.; GUILHERME, L.C.; KERR, W.E. Teste de micronúcleo e ensaio de esterases aplicados ao biomonitoramento dos efeitos da cipermetrina. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54., 2008, Salvador. Resumos do 54<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética. Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

MORON, S.E.; POLEZ, V. L.; ARTONI, R.F.; RIBAS, J. L.; KAZUYUKI, T. Estudo das alterações na concentração de íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina. **Jornal da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia**. v.1, n.1, p.1-4, jan. 2006.

MSDS BAG no 065041/10 de 30 de julho de 2004. Disponível em: [www.acpccp.com.br/prodei/337/produto\\_337.pdf](http://www.acpccp.com.br/prodei/337/produto_337.pdf). acesso em: março de 2007.

NARDOCCI, A.C. Avaliação em reuso de água. In: MANCUSO, P.C.S; SANTOS, H.F. (Editores). **Reuso de água**. 1ª Ed. Barueri, SP: Manole, 2003. p.403 – 431.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E.; **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, p.413 - 432.

NATH, R.; BANERJEE, V. Effect of pesticides methylparathion and cypermethrin on the air-breathing fish *Heteropneustes fossilis*. **Environ. Ecol. Stat.** v.14, p.163-165, 1996.

NEMR, A. E.; ABD-ALLAH, A. M. A. Organochlorine contamination in some marketable fish in Egypt. *Chemosphere*, **Oxon**, v.54, p.1401-1406, 2004.

NOGA, E.J. **Fish Disease, Diagnosis and Treatment**. Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1996. 367p.

OOST, R. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.13 p.57-149, 2003.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and Nordic freshwater fish. **Environmental Research**, v.83, p. 286-292, 2000.

PALHARES, D.; GRISOLIA, C.K. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p.281-284, 2002.

PAVANELLI, G.C. J.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá. EDUEM, 2002, 305p.

PAWLOWSKY, U. Tratabilidade de Efluentes de Fabricação de Herbicidas. Tese para Concurso Público de Professor Titular de Engenharia Ambiental – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994, 318p.

PEAKALL, D. B. The use of biomarkers in hazard assessment. In: Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in eastern Europe. 1 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v. 1 (9), p.123-133, 1999.

PEHKONEN, S.O.; ZHANG, Q. The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, Boca Raton*, v. 32, n. 1, p. 17-72, 2002.

PIMPÃO, C.T. Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: estudo bioquímico e imunológico. 2006. 102p. Tese (Doutorado em Saúde animal) – Setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PORTO, M.S.A. Indicadores de estresse em peixes da Amazônia em face do tipo de estressor. 2005. 38p. Dissertação (mestrado em ciências biológicas) – Instituto nacional de pesquisas da Amazônia, UFAM, Manaus, 2005.

PORTO, J.I.R.; ARAUJO, C.S.O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. *Environmental Research*, v.97, p.287-292, 2005.

POST, G. **Textbook of fish health**. New Jersey: T.F.H. Public., 1987. 210p.

RAMSDORF, W. UTILIZAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) COMO BIOINDICADORES DE REGIÃO CONTAMINADA POR AGROTÓXICO (FAZENDA CANGÜIRI – UFPR. 2007. 127p. Dissertação (mestrado em genética) – Departamento de genética da Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba-PR, 2006.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. 245p.

RANZANI-PAIVA MJ, ISHIKAWA CM, PORTELLA MC, CELIBERTO RJ Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2,-tricloroetilo (Neguvon). **Boletim do Instituto Pesca**, 14: 83-92, 1987.

\_\_\_\_\_; RODRIGUES, E.L.; EIRAS, A.C.; VEIGA, M. L.; PACHECO, F. J. Alterações Hematológicas em Curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.24, p.187-196, 1997

\_\_\_\_\_; SALLES, F.A.; EIRAS, J.C. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), das estações de piscicultura do instituto de pesca, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.25 (único), p. 77-83, 1999.

RODRIGUES E. L.; RANZANI – PAIVA, M. J.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L.; EIRAS, A. C. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, p.197-203, 1997.



RODRIGUES, A.P.C.; CASTILHOS, Z.C. Avaliação de Risco Ecológico em Ecossistemas Aquáticos Contaminados por Mercúrio. Estudo de caso: Ilha das Enxadas, Baía de Guanabara, RJ. **JIC-CETEM**, RJ. 2003

RUPLEY, A.E. **Manual of Avian Practice**. W.B. Saunders Company, Philadelphia PA. 1997, 126p.

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M.A.; STINGO, V. Assessment of Environmental stress by the micronucleus test and the comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p.168-174, 2004.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American fresh water fishes: a review. **Aquaculture**, Baton Rouge, v. 54, p. 205-240, 1986.

SAMPATH, K.; VELAMMAL, S.; KENNEDY, I.J.; JAMES, R. Haematological changes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* as a function of exposure period and sublethal levels of Ekalux. **Acta Hydrob.** v. 35, p. 73-83, 1993.

SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.N. CUNHA BASTOS, V.L.F.; ALVES, M.V.; CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas para biomarcação com colinesterase em peixes. In: ESPINDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA NETO, A.L. (Eds). **Ecotoxicologia: perspectiva para o séc. XXI**. São Carlos: RIMA, 2000. p.147 - 164.

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

SIWICKI, A.K.; COSSARINI-DUNIER, M.; STUDNICKA, M.; DEMAEL, A. In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. **Ecotoxiol. Environ. Saf.** v.19, p.99-105, 1990.

SOGORB, M. A., VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters (Shannon)**, v.128, p.215-228, 2002.

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

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R.J.; FORLIN, L.; FOWLER, B.M.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P. Molecular responder to environmental contaminations: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect, In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M. Jr.; BERGMAN, H.L. (eds.), **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological markers of Anthropogenic Stress**. Lewis publisher, MI, USA: p.253-336. 1992.



STRUNJAK-PEROVIC, I.; COZ-RAKOVAC, R.; TOPIC-POPOVIC, N. Micronucleus occurrence in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Veterinary Medicine**, v.48, p.215-219, 2003.

SVOBODOVÁ, Z.; VYKUSOVÁ, B.; MA'CHOVÁ, J. The effects of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. In MÜLLER, R.; LLOYD, R. (eds), **Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish**. FAO Fishing News Books, Great Britain, 1994. p.39–52

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, p.457-465, 2001.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. I. Série vermelha e dosagens de cortisol e glicose do plasma sanguíneo de espécimes de *Colossoma macropomum* em condições de cultivo. **Acta Scientiarum**. v.20, p.157-160, 1998.

\_\_\_\_\_; MARTINS, M.L.; KRONKA, S.N. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustácea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.16, n.2, p.553-555, 1999a.

\_\_\_\_\_; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R. e PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum** v.21, p.337-342, 1999b.

\_\_\_\_\_, SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (CHARACIDAE) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27, p.43-48, 2001.

\_\_\_\_\_; MORAES, F.R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ed. Eletrônica e Arte Final. Riberão Preto. SP. 2004. 144p.

\_\_\_\_\_; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish A cytochemical study and ultrastructural analysis. **J. Appl. Ichthyol**, v.23, p.709-712, 2007.

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

TOMLIN, C. **The pesticide manual – a word compendium**. 10.ed. Local: Crop Protection Publication, 1995. 1606p.

THRALL, M.A. (2004) Hematology of amphibians, *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2004.

THUVANDER, A.; WISS, E.; NORRGREN, L. Sublethal exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Clophen A50: effects on cellular immunity. **Fish Shellfish Immunol.** v.3, p.107-177, 2002.

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

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Guidelines for the health: risk assessment guidance for superfund (RAGS). Washington 2002. Disponível em: <[www.epa.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7](http://www.epa.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7)>. Acesso em: 05/07/2007.

USEPA, January 1996. ECO Update, EPA 540/F9/ 038, PB95963324, Office of Solid Waste and Emergency Response.

VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M.T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish Shellfish Immunol.** v.13, p.183-198, 2002.

VALENZUELA, A.; OYARZÚN, C.; SILVA, V. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (*Elasmobranchii, Scyliorhinidae*): serie blanca. *Gayana*, v.67, p.130 – 137, 2003.

VARÓ, I; SERRANO, PITARCH, E.; AMAT, F.; LÓPEZ, F. J.; NAVARRO, J. C. Toxicity and bioconcentration of Chlorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, New York**, v.65, p.623-630, 2000.

VIEIRA, V.P.P.B.; **Análise de Riscos em Recursos Hídricos: Fundamentos e Aplicações.** Porto Alegre: ABRH, 2005. 372p.

VILLELA, I.V.; LAU, A.H., SILVEIRA, J.C. PRAD, D.; ROLLA, H.C.; SILVEIRA, J.D. . Bioensaios para monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: Juliana da Silva; Bernardo Erdtmann; João Pêgas Henriques. (org). *Genética Toxicológica*. 1 ed. Porto Alegre: Alcance, 2003, v., p.147-166.

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

WINTROBE, M.M. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Foglia Haematologica**, v.51, p.32-49, 1934.

\_\_\_\_\_. Leukokinetic Studies 13. A non-steady-state kinetic evaluation of mechanism of cortisone-induced granulocytosis. **Journal of Clinical Investigation**, v.47, p.249–258. 1968.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 97 – Deltamethrin.** Geneva:International Programme on Chemical Safety – IPCS, 1990.

\_\_\_\_\_ International Programme on Chemical Safety (IPCS) – **Environmental Health Criteria: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva, 1993, 155p.

\_\_\_\_\_ **Environmental Health Criteria 132**. Geneva: WHO, 1992. 162p.

\_\_\_\_\_ **Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace**. v.1 e 2. Geneva; 1996.

ZAGATO, P.A.; Ecotoxicologia. In ZAGATO, P. A. & BERTOLETTI, E.; **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, p. 13-25.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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