

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

ALINE APARECIDA RIBEIRO

Alterações morfofuncionais em juvenis de pintados (*Pseudoplatystoma
corruscans* Spix & Agassiz, 1829) expostos a um herbicida a base de glifosato

Maringá

2015

ALINE APARECIDA RIBEIRO

Alterações morfofuncionais em juvenis de pintados (*Pseudoplatystoma
corruscans* Spix & Agassiz, 1829) expostos a um herbicida a base de glifosato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Profa. Dra. Evanilde Benedito
Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Melo Germano

Maringá
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R484a Ribeiro, Aline Aparecida
Alterações morfofuncionais em juvenis de pintados
(*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829)
expostos a um herbicida a base de glifosato / Aline
Aparecida Ribeiro. -- Maringá, 2015.
37 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Evanilde Benedito
Cecílio.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo de Melo Germano.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2015.

1. Toxicidade crônica. 2. Histopatologia. 3.
Poluição aquática. 4. Herbicida. 5. Tecido hepático.
I. Cecílio, Evanilde Benedito, orient. II. Germano,
Ricardo de Melo, coorient. III. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. IV.
Título.

CDD 21.ed. 571.517

AHS-002789

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALINE APARECIDA RIBEIRO

Alterações morfofuncionais em juvenis de pintados (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829) expostos a um herbicida a base de glifosato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Evanilde Benedito
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dra. Luciana Kazue Otutumi
Universidade Paranaense

Profa. Dra. Ivaldete Tijolin Barros
Companhia de Saneamento do Paraná

Aprovada em: 23 de fevereiro de 2015.

Local de defesa: Anfiteatro, Bloco H79, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

Aos meus pais, João e Augusta, de quem muito me orgulho. Vocês são meus maiores exemplos! Meu muito obrigada por tudo! Amo vocês!

Aos meus irmãos Luciana, Marcos, Cláudio e Solange, de quem muito me orgulham também! Obrigada por todo incentivo e por acreditarem em mim!

À Evanilde Benedito, minha orientadora, por toda ajuda, paciência, incentivo e confiança. Muito obrigada pela oportunidade concedida. Obrigada por sempre me incentivar a fazer o meu melhor, e por tudo o que aprendi com você ao longo destes dois anos. Muito obrigada por tudo!

Ao professor e amigo Ricardo Germano, que sempre me incentivou a continuar os estudos após a graduação. Obrigada pela paciência, pela convivência e por tudo que me ensinou durante todo o tempo que trabalhamos juntos. Você é meu exemplo!

Às minhas grandes e inesquecíveis amigas Anamaria Figueiredo, Nathália Diamante, Natália Figueiredo e Larissa Siqueira por fazerem parte, sem dúvida alguma, dos melhores momentos desta jornada.

Aos colegas de laboratório Gislaine Manetta, Fábio Fogaça, Vivian Cionek, Lary Helena, Patrícia Sacramento, Regiane Silva, Leandro Fiori, Lucas Lolis e Lucas Milani por estarem sempre dispostos a ajudar e pelos agradáveis momentos de convivência.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Comparada da Universidade Estadual de Maringá, muito obrigada!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser.

E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.

Tudo depende só de mim.

(CHARLES CHAPLIN)

Alterações morfofuncionais em juvenis de pintados (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829) expostos a um herbicida a base de glifosato

RESUMO

Herbicidas comerciais formulados à base de glifosato têm sido amplamente utilizados em áreas agrícolas e não agrícolas de todo o mundo. A presença destes poluentes no ambiente aquático pode causar diversos efeitos em todos os níveis da organização biológica. Portanto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar as alterações hepáticas do herbicida Roundup WG[®] sobre juvenis de *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) expostos a três diferentes concentrações deste composto químico: 0,25 g/1000L, 0,50g/1000L e 0,75g/1000L, mais tratamento controle. O experimento teve duração de 60 dias e ao final deste período os animais foram anestesiados com benzocaína e em seguida eutanasiados por meio da secção medular. Os fragmentos de fígado foram fixados em formalina, sendo feito, posteriormente, o processamento histológico de rotina, utilizando-se como corantes hematoxilina-eosina (HE). Apenas o grupo controle teve aumento estatisticamente significativo de massa corpórea durante o experimento, ocorrendo o mesmo com o comprimento. A glicose sanguínea não apresentou diferença entre os grupos experimentais. As lesões encontradas no fígado consideradas severas foram hemorragia, vacuolização e hipertrofia dos hepatócitos e presença de melanomacrófagos livres, registradas nos grupos expostos a 0,50 e 0,75g/1000L. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o herbicida Roundup WG[®] promove alterações importantes em *Pseudoplatystoma corruscans*.

Palavras-chave: Toxicidade crônica. Histopatologia. Poluição aquática. Hematoxilina-Eosina. Tecido hepático.

Morphological changes in pintados juveniles (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829) exposed to an herbicide glyphosate

ABSTRACT

Commercial herbicides formulated with glyphosate has been widely used in agricultural and non-agricultural areas throughout the world. The presence of these pollutants in the aquatic environment can cause different effects at all levels of biological organization. Therefore, the present study was to evaluate the hepatic abnormalities of Roundup herbicide WG® on juvenile *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) exposed to three different concentrations of this chemical compound: 0.25 g / 1000L, 0.50g / 1000L and 0.75 g / 1000L, more control treatment. The experiment lasted 60 days and the end of this period, the animals were anesthetized and then euthanized by spinal cord section. Liver fragments were fixed in formalin, and made subsequently routine histological processing, using as hematoxylin-eosin (HE). Only the control group had statistically significant increase in body mass during the experiment, the same happened with the length. Blood glucose was not different among groups. The lesions found in the liver were considered severe bleeding, vacuolization and hepatocyte hypertrophy and presence of free melanomacrophages, registered in the groups exposed to 0.50 and 0.75 g / 1000L. The results of this study showed that Roundup herbicide WG® promotes important changes in *Pseudoplatystoma corruscans*.

Keywords: Chronic toxicity. Histopathology. Water Pollution. Hematoxylin-eosin. Hepatic tissue.

SUMÁRIO

Capítulo 1	10
1. Introdução	11
2. Revisão bibliográfica	12
2.1 Pesticidas e poluição aquática	13
2.2 Pesticidas a base de glifosato	14
2.3 Toxicidade de pesticidas a base de glifosato	15
2.4 Histologia	16
3. Referências bibliográficas.....	18
Capítulo 2	22
Anexo 1	23
Alterações histohepáticas em peixe de importância comercial (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> Spix & Agassiz, 1829) expostos a um herbicida a base de glifosato.....	27
Resumo	28
Abstract.....	28
Introdução	29
Materiais e métodos	30
Resultados e discussão	31
Referências bibliográficas.....	34

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

No Brasil, o consumo de compostos químicos para o controle de pragas em plantações tem crescido de forma proporcional ao crescimento do agronegócio. Atualmente, somos considerados o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, isto, devido ao grande aumento no cultivo de monoculturas. Estima-se que são utilizadas mais de um milhão de toneladas de defensivos agrícolas por ano, o que corresponde a mais de um bilhão de litros aplicados anualmente em nossas lavouras (BRASIL, 2015).

No solo, os pesticidas ficam sujeitos a processos físicos, químicos e biológicos que irão influenciar sua atividade e determinar sua permanência ou não no local. Caso não sejam absorvidos pelas plantas, podem ser carregados pela água das chuvas ou, ainda, sofrer lixiviação e chegar ao lençol freático (BANERJEE; HOMECHAUDHRI, 2008). Além disto, o uso excessivo e inadequado destas substâncias associado à destruição da cobertura vegetal dos solos para plantio, a não preservação das matas-ciliares, dentre outros fatores, são os principais responsáveis por grande parte dos problemas de contaminação dos recursos hídricos e dos organismos ali presentes (MOURA; FRANCO; MATALLO, 2008).

O glifosato (N-phosphonomethyl glycine) é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas que apresenta largo espectro de ação, o que possibilita o controle de plantas daninhas anuais e perenes (GALLI; MONTEZUMA, 2005). Na agricultura é aplicado principalmente em culturas de soja, arroz irrigado, milho, cana-de-açúcar e em pastagens, em geral (AMARANTE JR. et al., 2002).

A avaliação das alterações morfológicas em tecidos de peixes tem se mostrado uma ferramenta útil para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos alvos. O fígado é um dos primeiros órgãos a sofrer a ação dos xenobióticos e a metabolizá-los para posterior excreção. Por este motivo tem sido amplamente utilizado como modelo para o estudo de efeitos dos fatores ambientais nas funções e estruturas hepáticas (MUNSHI et al., 1996).

Portanto, estudar os efeitos dos compostos químicos produzidos pelo homem sobre os organismos aquáticos pode ser uma ferramenta muito importante para a avaliação de impactos de poluentes sobre a biota aquática (LOMBARDI, 2004).

2. Revisão Bibliográfica

A produção agrícola mundial é baseada no aumento da produtividade. Esta necessidade de se aumentar a produção de alimentos incentivou o desenvolvimento de culturas com ciclos de produção mais curtos e, conseqüentemente, tornou-se cada vez maior a utilização de fertilizantes, adubos químicos e substâncias que auxiliam no controle de pragas (TAUCHERT, 2006). Deste então, os pesticidas têm sido cada vez mais utilizados para a manutenção dos sistemas de produção agrícola.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2015), o Brasil é o país que mais produz e mais consome agrotóxicos do mundo. No território brasileiro, o mercado destes produtos cresceu mais de 170% na última década, sendo quatro vezes maior que a média mundial.

A utilização e comercialização de pesticidas no Brasil estão disciplinadas na Lei nº 7.802, de 11 de janeiro de 1989, e regulamentadas no Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990. Este decreto classificou os pesticidas em função da sua utilização, modo de ação e potencial ecotoxicológico ao homem e aos demais organismos vivos presentes no ambiente. Foram estabelecidas 4 (quatro) classes de toxicidade: I, II, III, IV, que se referem a extremamente tóxicos, altamente tóxicos, medianamente tóxicos e pouco tóxicos, respectivamente (COMPÊNDIO, 1996).

A Portaria Normativa nº 139, de 21 de dezembro de 1994, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, com base no Decreto nº 98.816/90, classificou os pesticidas quanto ao potencial de periculosidade ambiental, levando-se em consideração as seguintes variáveis: bioacumulação, persistência, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Os produtos foram classificados em I, II, III, IV: altamente perigoso, muito perigoso, perigoso e pouco perigoso, respectivamente (COMPÊNDIO, 1996).

O uso excessivo e inadequado destas substâncias associado à destruição da cobertura vegetal dos solos para plantio, a não preservação das matas-ciliares, dentre outros fatores, mesmo em áreas próprias para a prática da agricultura, potencializam o transporte de partículas de pesticidas presentes no solo para os corpos de água (LOURENÇATO, 2010). A cobertura inadequada do solo gera perda gradativa da matéria orgânica, que é fundamental para o aumento da infiltração (KOBAYAMA; MINELLA; FABRIS, 2001). As matas ciliares, por sua vez, funcionam como reguladores do fluxo de água, sedimentos e nutrientes entre o

ecossistema terrestre e aquático, sendo essenciais para a proteção do solo e dos recursos hídricos (SOARES DA SILVA, 2000).

2.1 Pesticidas e poluição aquática

A água é indispensável à vida e fundamental para a prática de diversas atividades econômicas. Sendo assim, a poluição ambiental aquática tem se tornado uma questão cada vez mais preocupante e amplamente discutida, já que tem comprometido de forma alarmante a qualidade deste recurso. Segundo Heath (1995) a poluição aquática consiste na adição de qualquer substância na água que altere sua composição química, temperatura ou composição microbiológica.

A presença desses poluentes no ambiente aquático pode causar diversos efeitos em todos os níveis da organização biológica. Mesmo em concentrações subletais, esses compostos podem causar alterações no organismo que comprometem seu comportamento, crescimento, desenvolvimento, estrutura dos tecidos e reprodução (JOBILING, 1995; RAND et al., 1995).

Os fatores que afetam o destino dos pesticidas no meio ambiente estão diretamente relacionados com sua forma de uso, características ambientais e propriedades físico-químicas do princípio ativo (LAABS et al., 2002). Portanto, quanto maior sua hidrossolubilidade, maior será também a facilidade de transporte até os cursos de água, rios e águas subterrâneas (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014).

Dependendo de suas características físico-químicas, uma vez na água, os resíduos dos pesticidas podem tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositarem no sedimento. Uma vez no sedimento, esses resíduos podem ser novamente liberados na água, sofrer alterações químicas, serem degradados por micro-organismos (RAND; PETROCELLI, 1985) ou serem absorvidos por organismos, podendo então ser detoxicados ou acumulados (SILVA; SANTOS, 2007). Podem ainda, serem transportados através do sistema aquático por difusão nas correntes de água ou nos corpos dos organismos aquáticos. Alguns herbicidas e/ou metabólitos, podem também retornar à atmosfera por volatilização (COSTA; OLIVI, 2008).

A capacidade de uma substância ser transportada para diferentes distâncias depende diretamente da estabilidade, estado físico do composto e da velocidade do fluxo hídrico, mas de forma geral, sua concentração diminui continuamente conforme aumenta a distância da

fonte (ALVES; SILVA, 2003). Apesar disto, não se exclui a possibilidade de ocorrência de concentrações muito elevadas do contaminante após fortes chuvas, principalmente quando áreas próximas tenham sido recentemente tratadas com doses altas de determinado pesticida (DORES; DELAMONICA-FREIRE, 2001).

Os pesticidas presentes em corpos de água podem penetrar nos organismos aquáticos através de diversas portas de entrada, e seu grau de acumulação depende do tipo de cadeia alimentar e da disponibilidade e persistência do contaminante na água. Os peixes e invertebrados podem acumular estes compostos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas nas quais eles vivem, uma vez que os mesmos podem ser ingeridos juntamente com o material particulado suspenso. Indivíduos jovens ou imaturos geralmente são mais suscetíveis aos agentes químicos do que os adultos (NIMMO, 1985). Além disto, pesticidas ou outros agentes químicos hidrossolúveis podem penetrar em um organismo através de toda a superfície do corpo, brânquias e boca (RAND; PETROCELLI, 1985), promovendo a bioacumulação e biomagnificação dos tóxicos ao longo da cadeia e/ou teia alimentar.

A bioacumulação dos contaminantes pode ocorrer por meio do contato direto entre o organismo e o composto químico por via cutânea, ou então, mais comumente, devido à atividade alimentar do animal (BAIRD, 2002). Pode levar a um processo de biomagnificação, que corresponde à passagem de um composto por vários elos da cadeia/teia alimentar. Mesmo que pequena, a concentração de um composto tóxico na água pode se tornar maior conforme o avançar de níveis tróficos. Vale lembrar que muitos animais que compõem uma cadeia alimentar podem também participar de outras, tornando a contaminação ainda mais grave (GORBA; GENTIL; STANBERG, 2001; HANAZATO, 2001; MATSUI, 2002; FROEHNER; MACENO, 2009). Dessa forma, águas poluídas e contendo compostos potencialmente bioacumulativos apresentam um risco considerável para a vida selvagem e humana (ROCHE et al., 2005).

2.2 Pesticidas a base de glifosato

Atualmente, os pesticidas formulados a base de glifosato ocupam o topo da lista dos compostos mais utilizados para o controle de pragas nos sistemas de cultivo, isto, devido a sua grande eficiência e ao custo relativamente baixo (SERVICE, 2007).

O glifosato é um herbicida sistêmico, com tempo de meia vida em torno de 32 dias (GALLI; MONTEZUMA, 2005), amplo espectro de ação, baixa seletividade, aplicação em pós-emergência e ação sistêmica (NEDELKOSKA; LOW, 2004). Além disto, é uma molécula estável em água e não sofre degradação fotoquímica (FAO/WHO, 1986)

Quando aplicados, os pesticidas são diretamente absorvidos pelas plantas, o que contribui para reduzir sua disponibilidade no ambiente. No entanto, parte do que foi aplicado fica retida no solo (ANDRÉA et al., 2004).

O glifosato é fortemente adsorvido pela maioria dos solos, o que reduz sua concentração na fração solubilizada dos mesmos. No entanto, uma vez adsorvido, permanece no ambiente até sua completa mineralização, que pode durar dias ou até meses (TONI; SANTANA; ZAIA, 2006). Os principais responsáveis pela degradação do glifosato no solo são uma grande variedade de micro-organismos que utilizam o produto como fonte de energia, fósforo, nitrogênio e carbono (MATTOS et al., 2002; BARJA; AFONSO, 2005).

Sua persistência na água é mais curta que sua persistência no solo, com valores de meia vida em torno de sete a 21 dias. Grande parte das formulações de glifosato são completamente solúveis em água e, por isso, se dissipam rapidamente, uma vez que é adsorvido pelo sedimento e degradado pelos microorganismos (PATERSON, 2007).

2.3 Toxicidade de pesticidas a base de glifosato

Embora o glifosato seja considerado um herbicida relativamente seguro e de baixa toxicidade, vários estudos já foram feitos com este composto químico e várias alterações foram relatadas.

Segundo Cox (1998) a exposição ao glifosato danifica ou até mesmo diminui a população de muitos animais terrestres, incluindo insetos benéficos, pássaros e minhocas, sendo que em alguns casos, mesmo em baixa concentração, letal a alguns animais.

Alterações histopatológicas de brânquias, fígado e rins de carpas expostas à diferentes concentrações de glifosato foram encontradas por Neskovic et al. (1996). As brânquias dos peixes expostas a 5,0 mg/L de glifosato apresentaram hiperplasia epitelial e edema subepitelial quando comparados com o grupo controle. Mudanças mais pronunciadas seguidas de infiltração de leucócitos, elevação e ruptura do epitélio respiratório em algumas lamelas secundárias foram registradas em peixes expostos a 10,0 mg/L de glifosato. Alterações no fígado apareceram apenas na concentração de 10,0 mg/L de glifosato,

representadas por congestionamento sinusoidal e fibrose focal, indicando sérios danos na estrutura do fígado. Por outro lado a estrutura renal não foi afetada.

Estudando os padrões ultraestruturais dos hepatócitos de carpas, Szarek et al. (2000) observaram hipertrofia nas mitocôndrias com desaparecimento de cristas e ausência da membrana externa na maioria dos peixes expostos a 205 mg/L de glifosato. Algumas células continham os complexos de Golgi aumentados e, muito frequentemente, os hepatócitos apresentaram vacúolos de diferentes tamanhos. A maioria dos peixes examinados tinham células mononucleares infiltradas no fígado. O exame ultraestrutural dos peixes expostos a 410 mg/L de glifosato revelou degeneração perceptível e desintegração da membrana externa das mitocôndrias. Grupos de hepatócitos com reduzido nível de glicogênio também foram observados.

Em estudo realizado por By, Kruse e Scarnecchia (2002) foram registradas alterações hepáticas como infiltração de linfócitos, ocorrência de melanomacrófagos e necrose focal em esturjão (*Acipenser transmontanus*) em estudo de bioacumulação de metais e pesticidas organoclorados.

Análises do tecido hepático do peixe paleatus (*Corydoras paleatus*), após exposição e ingestão do pesticida organofosforado Folidol também já foram feitas. As alterações mais encontradas foram: degeneração celular, vacuolização citoplasmática, estagnação biliar e presença de núcleos picnóticos (FANTA et al., 2003).

Langiano e Martinez (2008) verificaram os efeitos de um herbicida à base de glifosato sobre peixes neotropicais e concluíram que a glicose plasmática do grupo exposto a 10 mg/L de Roundup durante 24 e 96 horas, foi significativamente mais elevada em relação ao grupo controle, assim como a catalase hepática. Foram evidenciadas ainda várias alterações histopatológicas no fígado, sendo elas: degeneração citoplasmática e nuclear, estagnação biliar, aumento do fluxo sanguíneo e vacúolos no citoplasma e no núcleo.

2.4 Histologia

As análises histopatológicas são bastante sensíveis para detectar efeitos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo, tanto em pesquisas realizadas em laboratório como em campo (SCHWAIGER et al., 1997).

Muitos compostos químicos podem ser encontrados nos ecossistemas aquáticos (JOBLING, 1995), normalmente, estes poluentes ocorrem em baixas concentrações, de modo

que alterações estruturais e fisiológicas são mais comuns que a mortalidade em massa (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

De modo geral, os poluentes exercem seus efeitos primeiro no nível enzimático, ou então alterando alguma função celular, como a permeabilidade das membranas. Se estas alterações são muito severas, muitas células podem morrer, resultando em lesões histológicas.

Como os órgãos são constituídos de vários tipos celulares, efeitos em um ou mais desses tipos podem comprometer sua função (HEATH, 1995). Ainda segundo o mesmo autor, a exposição crônica a contaminantes também pode deprimir o crescimento e o processo reprodutivo, que é um dos processos mais afetados pela poluição.

O fígado é o principal órgão na biotransformação dos xenobióticos. Devido a sua função no metabolismo e sua sensibilidade a poluentes do ambiente, tem se destacado em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de várias espécies de peixes por agentes químicos (HINTON et al., 1992).

No Brasil, ainda há poucos estudos realizados sobre os efeitos do herbicida Roundup em espécies peixes, portanto, existe a necessidade de se ampliar o conhecimento sobre os efeitos que este importante herbicida pode causar na ictiofauna.

O *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829), também conhecido como pintado, é um siluriforme piscívoro do topo da cadeia alimentar, da família Pimelodidae, proveniente da América do Sul (PETRERE, 1995; WELCOMME, 1985), que pode atingir mais que 120 kg (SATO; CARDOSO; SALLUM, 1988). Como a maioria dos siluriformes, o pintado tem vida noturna, caçando pequenos peixes, crustáceos, vermes e, ao engoli-los, ingere também lama e areia grossa (SANTOS, 1987). Trata-se de um dos peixes mais apreciados pelo mercado consumidor brasileiro, devido à excelente qualidade do filé. Esta espécie possui um considerável potencial em aquicultura, destacando-se como um dos peixes preferidos na pesca de água doce por possuir um grande porte. Segundo Miranda e Ribeiro (1997), o pintado possui bons índices zootécnicos, o que contribui para que este seja um animal de excelente potencial comercial.

Assim, considerando-se a importância do herbicida Roundup, que é um dos pesticidas mais utilizados na agricultura moderna no mundo e no Brasil, e devido ao fato de muitos dos pesticidas alcançarem o ambiente aquático, torna-se necessária a realização de testes de toxicidade que avaliem os efeitos deste herbicida em espécies de peixes.

3. Referências bibliográficas

- ALVES, S. R.; SILVA, J. J. O. Avaliação de ambientes contaminados por agrotóxicos. In.: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Org.). **É veneno ou é remédio**. Agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. 384p.
- AMARANTE Jr., O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.
- ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; SAVOY, V. L. T.; MATALLO, M. B. Glyphosate: influência na biota do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 1, p. 95-100, 2004.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BANERJEE, S.; HOMECHAUDHRI, S. Hematological monitoring of a bioindicator fish, *Heteropneustes fossilis*, on exposure to copper toxicity. **Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah**, p.46-51, 2008.
- BARJA, B. C.; AFONSO, M. S. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. **Environmental Science & Technology**, Iowa, v.39, n.2, p.585-592, 2005.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Agrotóxicos**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: Janeiro 2015.
- BY, G.; KRUSE, O.; SCARNECCHIA, D. L. Assesment of bioaccumulated metal and organochlorine compounds in relation to physiological biomarkers in Kootenai River white sturgeon. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 18, p. 430-438, 2002.
- COMPÊNDIO de Defensivos Agrícolas. 5. ed. São Paulo: Andrei, 1996. 506 p.
- COSTA, C.R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de Avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- COX, C. Glyphosate (Roundup). **Journal of Pesticide Reform**, v.18, p. 3-17, 1998.
- DELLAMATRICE, P. M., MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n. 18, v. 12, p. 1296-1301, 2014.
- DORES, E. F. G. C.; DELAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, p.1-18. 2001.
- FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. G.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.54, p.119-130, 2003.
- FAO/WHO. **Pesticide residues in food – 1986. Evaluations. Part I – residues**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Rome, 1986.
- FROEHNER, S.; MACENO, M. Assessment of bioaccumulation of biphenyls in the trophic chain of a coastal area of Parana, Brazil. **Environmental Monitoring in Assessment**, v.169, p.45-59, 2009.

- GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Monsanto, São Paulo: ACADCOM, 2005.
- GORBA, K.; GENTIL, M. C.; STANBERG, F. Accumulation of pesticides a baters sea food chain. **The Science of the Total Environmental Pollution**, v.125, 2002.
- HANAZATO, T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. **Environmental Pollution**, v. 112, n .2, p. 10, 2001.
- HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. 2 ed. Florida: CRC Press, 384p, 1995.
- HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIRINO, M. S. Histopathology biomarkers. Em: HUGGET, T. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE Jr., P. M.; BERGAMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress**. Florida: Lewis, p. 155-209, 1992.
- JOBLING, M. Human impacts on aquatic environments. **Environmental Biology of Fishes**. Chapman & Hall, London, 1995.
- KOBIYAMA, M.; MINELLA, J. P.; FABRIS, R. Áreas degradadas e sua recuperação. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.22, n.210, p.10-17, maio/junho, 2001.
- LAABS, V.; AMELING, W.; PINTO, A. A.; WARTZEN, M.; SILVA, C. J.; ZECH, W. Pesticides insurface water, sediment, rainfall of the northeastern Pantanal Basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.1636-1648, 2002.
- LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.147, p.222-231, 2008.
- LOMBARDI, J. V. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (Eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004.
- LOURENÇATO, L. F. **Potencial de contaminação de águas superficiais por agrotóxicos na microbacia hidrográfica do Campestre, Colombo, PR**. Curitiba: UFPR, 2010. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- MATSUI, S. **Diretrizes para o gerenciamento de lagos: gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios**. São Carlos: International Institute of Ecology, 2002, 216p.
- MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P. PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glyphosate e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.12, n. 1, p.145-154, 2002.
- MIRANDA, M. O. T.; RIBEIRO, L. P. Características zootécnicas do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) Surubim. Belo Horizonte: IBAMA, v. 19, p. 43-56, 1997.
- MOURA, M. A. M.; FRANCO, D. A. S.; MATALLO, M. B. Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**, p. 142-151, 2008.
- MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, G. R.; SINGH, N. K.; ADHIKARI, S.; RICHMONDS, C. R. Age related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity of *Heteropneustes fossilis* (Bloch) by malathion Comp. **Journal of Physiology and Biochemistry**. n. 2, v. 111A, p. 331-334, 1996.

- NEDELKOSKA, T. V.; LOW, G. K. C. High-performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate. **Analytica Chimica Acta**. v. 511, p. 145-153, 2004.
- NESKOVIC, N. K.; POLEKSIC, V.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; BUDIMIR, M. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 56, p. 295-302, 1996.
- NIMMO, D. R. Pesticides, In: Rand, G. M.; Petrocelli, S.R. (Eds.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 1985.
- PATERSON, M. Glyphosate Análisis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppfead1/endanger/effects/glyphosateanalysis.pdf>, acesso: 12 out. 2014.
- PETREIRE J. R. M. A pesca de água doce no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 19, n. 110, p. 28-33. 1995.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R.; Lloyd, R. **Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish**. Fishing News Books, Oxford, v. 30, p. 339-352, 1994.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing, 1985. 666 p.
- RAND, G.M.; WELLS, P.G. AND MCCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2nd. ed. UK: Taylor & Francis, 1995.
- ROCHE, H.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; RIBEIRO, C.A.O. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**. v.74, p.53-69, 2005.
- SANTOS, E. **Peixes da água doce**. 4. ed. Belo Horizonte: Itatiaia, 1987. 267 p. v. 2.
- SATO, Y.; CARDOSO, E. L.; SALLUM, W. B. Reprodução induzida do Surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) da bacia do São Francisco. In: **Encontro anual de aquicultura**, 1988.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **J. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. v. 6, p. 75-86, 1997.
- SERVICE, R. F. A growing threat down on the farm. **Science**, v. 316, p.1114-1117, 2007
- SILVA, J. M; SANTOS, J. R. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oceologia Brasiliensis**, v. 11, p.565-573, 2007.
- SOARES DA SILVA, N. L. Diagnostico da Situação atual da Mata Ciliar na Microbacia do arroio Guavirá no Município de Marechal Cândido Rondon (PR) In: Simpósio Paranaense de Mata Ciliar, 1. 20 a 24 nov. 2000, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/IAP, 2000.
- SZAREK, J.; SIWICK, A.; ANDRZEJEWSKA, A.; TERECH-MAJEWSKA, E.; BANASZKIEWICS, T. Effects of the herbicide Roundup™ on these ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). **Marine Environmental Research**. v. 50, p. 236–266, 2000.

TAUCHERT, E. Degradação de espécies organocloradas por processos avançados envolvendo ferro metálico. Curitiba: UFPR, 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LOURENÇATO, L. F. **Potencial de contaminação de águas superficiais por agrotóxicos na microbacia hidrográfica do Campestre, Colombo, PR.** Curitiba: UFPR, 2010. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p.829-833, 2006.

WELCOMME, R. L. River fisheries. In: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Fisheries Technical Papers**. Roma: FAO, 1985. p. 330.

CAPÍTULO 2

Alterações histohepáticas em pintados (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829) expostos a um herbicida a base de glifosato

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* – ISSN 0007-4861.

ANEXO 1

Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology – ISSN 0007-4861.

Instructions for Authors

We request one level of heading in all manuscripts.

General

Articles suitable for inclusion in Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology should be short in length. Manuscripts must be in good, idiomatic English and must not exceed 8 single spaced pages, including figures, tables, and references. In the transmittal/cover letter, authors are required to recommend the names of at least two manuscript reviewers not affiliated with the authors' institutions. In addition, please provide rationale (e.g. expertise in a relevant area covered in manuscript) for selecting each of your recommended reviewers. Manuscripts without a transmittal letter and reviewer recommendations will be returned. Authors must describe the novelty or significance of their study and provide reason(s) for suitability for publication in BECT. Submitted manuscripts must include page and line numbers. Additionally, tables and figures must be inserted within the text or they will be returned. Finally, it is required that you only provide the following headings only, without any subheadings: Abstract, Keywords, Introduction, Methods and Materials, Results and Discussion, Acknowledgments and References).

We are striving to be a journal that provides rapid review and publication. Our current turnaround time for papers that are accepted for publication is approximately 4 months from the time your paper is submitted until it is accepted for publication.

Before proceeding to the “Manuscript Submission” tab, please take the time to read the Aims and Scope of BECT to ensure that your subject matter and content meet the outlined requirements.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please

follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 100 to 150 words

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

- Use a normal, 12-point Times New Roman for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- [Word template \(zip, 154 kB\)](#)

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in

prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd ed. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

Scientific style

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)

Bold for vectors, tensors, and matrices.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Alterações histohepáticas em pintados (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829) expostos a um herbicida a base de glifosato

**ALINE APARECIDA RIBEIRO¹, RICARDO DE MELO GERMANO² and
EVANILDE BENEDITO¹**

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Laboratório de Ecologia Energética, Universidade Estadual de Maringá/UEM, Avenida Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil – CEP 87020-900.
alineribeirovai@gmail.com. (44) 3422-2735

² Docente do Mestrado em Ciência Animal, Universidade Paranaense/UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes, S/N, Umuarama, Paraná, Brasil – CEP 87705-000.
germano@unipar.br. (44) 3621-2828 – ramal 1365.

³ Docente do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Laboratório de Ecologia Energética, Universidade Estadual de Maringá/UEM, Avenida Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil – CEP 87020-900.
eva@nupelia.uem.br. (44) 3011-4605 / 3011-4625

RESUMO

A presença de herbicidas no ambiente aquático pode causar diversos efeitos em todos os níveis da organização biológica. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações hepáticas do herbicida Roundup WG[®] sobre juvenis *Pseudoplatystoma corruscans* expostos a três diferentes concentrações deste composto químico: 0,25 g/1000L, 0,50g/1000L e 0,75g/1000L, mais tratamento controle (0,00g/1000L). O experimento teve duração de sessenta dias e, ao final, foram coletados fragmentos de para posterior processamento histológico, utilizando-se como corantes hematoxilina-eosina (HE). Apenas o grupo controle teve aumento estatisticamente significativo de massa corpórea durante o experimento, ocorrendo o mesmo com o comprimento. A glicose sanguínea também não apresentou diferença entre os grupos amostrais. As lesões encontradas no fígado consideradas severas foram hemorragia, vacuolização e hipertrofia dos hepatócitos e presença de melanomacrófagos livres, registradas nos grupos expostos a 0,50 e 0,75g/1000L. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o herbicida Roundup WG[®] promove alterações importantes em *Pseudoplatystoma corruscans*.

Palavras-chave: Toxicidade crônica, histopatologia, herbicidas, poluição aquática.

ABSTRACT

The presence of herbicides in the aquatic environment can cause different effects at all levels of biological organization. The objective of this study was to evaluate the hepatic abnormalities of Roundup herbicide WG[®] on juvenile *Pseudoplatystoma corruscans* exposed to three different concentrations of this chemical compound: 0.25 g / 1000L, 0.50g / 1000L and 0.75 g / 1000L, more control treatment (0,00g / 1000L). The experiment lasted sixty days and at the end, fragments were collected for subsequent histological processing, using as hematoxylin-eosin (HE). Only the control group had statistically significant increase in body mass during the experiment, the same happened with the length. Blood glucose also no difference between the sample groups. The lesions found in the liver were considered severe bleeding, vacuolization and hepatocyte hypertrophy and presence of free melanomacrophages, registered in the groups exposed to 0.50 and 0.75 g / 1000L. The results of this work show that the herbicide Roundup WG[®] promotes important changes in *Pseudoplatystoma corruscans*.

Keywords: Chronic toxicity, histopathology, herbicides, water pollution.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o consumo de compostos químicos para o controle de pragas em plantações tem crescido de forma proporcional ao crescimento do agronegócio, isto, devido ao grande aumento no cultivo de monoculturas (Tauchert 2006).

Quando aplicados diretamente no solo, os herbicidas ficam sujeitos a processos físicos, químicos e biológicos que influenciarão sua atividade e determinarão sua permanência ou não no local. Moléculas com baixa taxa de degradação podem permanecer no ambiente sem sofrer qualquer alteração e, se não forem absorvidas pelas plantas, podem ficar fortemente adsorvidas à matéria orgânica, serem carregadas pela água das chuvas ou, ainda, sofrerem lixiviação e chegar ao lençol freático (Sanchez 2003; Hesketh et al. 2006).

Uma vez no ambiente aquático e dependendo de suas características físico-químicas, as moléculas de herbicidas podem se ligar ao material particulado em suspensão, se depositar no fundo do sedimento ou, ainda, serem absorvidas por organismos aquáticos para serem detoxificados ou acumulados (Silva and Santos 2007; Costa and Olivi 2008).

Os herbicidas presentes em corpos de água podem penetrar nos organismos aquáticos através de diversas portas de entrada, e seu grau de acumulação depende da disponibilidade e persistência do contaminante na água. Os peixes e invertebrados podem acumular em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas nas quais eles vivem, uma vez que os mesmos podem ser ingeridos juntamente com o material particulado suspenso. Além disto, herbicidas ou outros agentes químicos hidrossolúveis podem penetrar em um organismo através de toda a superfície do corpo, brânquias e boca, podendo ser bioacumulados e biomagnificados ao longo da cadeia e/ou teia alimentar (Rand and Petrocelli 1985).

Alterações histológicas em tecidos de peixes constituem uma importante ferramenta para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos alvo, sendo, portanto, consideradas excelentes indicadoras de exposição a estressores ambientais (Hinton et al. 1992; Schwaiger et al. 1997).

Em peixes, o fígado é um dos primeiros órgãos a sofrer a ação dos xenobióticos e a metabolizá-los para posterior excreção, por este motivo tem sido amplamente utilizado como modelo para o estudo dos efeitos de contaminantes nas funções e estruturas hepáticas (Munshi et al. 1996).

O glifosato é um herbicida pós-emergente orgânico e não seletivo que é usado tanto em áreas agrícolas como não agrícolas em todo o mundo (Galli and Montezuma 2005). Na agricultura é amplamente utilizado em culturas geneticamente modificadas e, com a liberação da produção comercial da soja transgênica, o Brasil pode chegar a consumir cerca de 200 milhões de litros anuais deste composto (Londres 2011).

Desta forma, considerando-se que herbicidas a base de glifosato têm sido amplamente utilizados no Brasil desde a década de 70 e a escassez de estudos de possíveis impactos no ambiente aquático causados por estas formulações, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações histológicas deste composto químico em fígado de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix & Agassiz, 1829).

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos expostos no presente trabalho estão de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram analisados e aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no uso de Animais em Experimentações da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo n°. 014/2014).

O experimento teve duração de 60 dias e foi realizado com juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) adquiridos de uma fazenda de produção e comércio de alevinos no estado de Mato Grosso do Sul, transportados juntamente com a Guia de Trânsito Animal (GTA) válida em todo território nacional, expedida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul.

Ao total, foram utilizados 32 peixes com pesos médios de $32,48 \pm 1,77$ gramas e $18,60 \pm 0,68$ centímetros de comprimento total. Antes do início do experimento os animais foram distribuídos em quatro tanques (n=8) de amianto com pintura impermeabilizante e aeração artificial, para aclimatação, por um período de duas semanas, sendo alimentados duas vezes ao dia com ração comercial extrusada com 40% de proteína bruta até saciedade aparente. Antes do início do experimento a alimentação foi suspensa por 24 horas, de acordo com as normas de ensaio de toxicidade com peixes estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993).

Após este período os peixes foram submetidos a três diferentes concentrações de Roundup WG[®]: 0,25 g/1000L, 0,50g/1000L e 0,75g/1000L, mais grupo controle (0,00g/1000L). As concentrações utilizadas foram escolhidas levando-se em conta o valor máximo permitido de glifosato em águas regulamentada pela Portaria MS 2914/2011 (aproximadamente 500µg/L de água), sendo empregada uma concentração entre este intervalo, uma 50% acima e uma 50% abaixo. Foram feitas duas contaminações, uma ao início e outra aos 30 dias do período experimental. Ao final do experimento, os animais de todos os grupos foram anestesiados com benzocaína (2g/150ml álcool/20L água) e em seguida eutanasiados por meio da secção medular.

Os fragmentos de fígado utilizados para as análises histológicas foram fixados em formalina comum por um período de 48 horas, sendo, posteriormente, a solução substituída por álcool 70%. Seguiu-se então o processamento histológico de rotina, utilizando-se como corantes Hematoxilina-Eosina (HE) (Luna, 1968). Para cada animal de cada grupo foi preparada uma lâmina com seis cortes. Os cortes foram analisados em microscópio de luz e as alterações encontradas foram classificadas individualmente de acordo com o grau de frequência da lesão no tecido, sendo que para campo foi estabelecida a seguinte pontuação: 0 – nenhuma alteração observada; 1 – alteração discreta (até duas ocorrências da alteração por lâmina); 2 – alteração moderada (de três a cinco ocorrências da alteração por lâmina) e 3 – alteração intensa (acima de cinco ocorrências da alteração por lâmina). A partir destes valores foi calculada a média do grau de alteração para cada grupo, sendo classificadas em discretas (0,1 a 1,0), moderadas (1,1 a 2,0) e intensas (acima de 2,1).

Para os dados biométricos usou-se a análise de variância ANOVA. Quando indicadas, as diferenças foram comparadas pelo teste de Tukey. Na análise das alterações histológicas foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dann, quando aplicável. Para todos os testes, foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos parâmetros biométricos, apenas o grupo controle (0,00g/1000L) teve aumento estatisticamente significativo de massa corpórea durante o experimento. Nos demais grupos, ao final do período experimental, apesar do ganho de peso, a diferença não foi significativa em relação ao início do experimento (Tabela 1). O mesmo ocorreu em relação ao comprimento dos animais, onde a diferença só foi considerada estatisticamente significativa no grupo que não estava exposto ao herbicida (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão de peso e comprimento dos peixes dos grupos expostos a diferentes concentrações do herbicida no início do experimento (Dia 0) e ao final do experimento (Dia 60).

	0,00g/1000L		0,25g/1000L		0,50g/1000L		0,75g/1000L	
	Dia 0	Dia 60	Dia 0	Dia 60	Dia 0	Dia 60	Dia 0	Dia 60
Peso (g)	32,85±1,61 ^a	43,99±5,68 ^b	32,72±1,60 ^a	38,56±13,06 ^a	32,14±1,78 ^a	37,25±13,30 ^a	32,24±2,11 ^a	36,20±12,94 ^a
Comprimento (cm)	18,36±0,51 ^a	22,08±1,46 ^b	18,88±0,82 ^a	21,18±2,31 ^a	18,48±0,84 ^a	20,89±1,99 ^a	18,68±0,58 ^a	20,65±2,06 ^a

Médias seguidas por letras diferentes, do mesmo grau de contaminação e na mesma linha, diferem entre si pelo teste t de Tukey ($P \leq 0,05$).

O pouco ganho de peso e o baixo crescimento total dos peixes sugerem que a busca pela manutenção do organismo, sob a ação do herbicida, requer uma grande demanda de energia e, um dos aspectos centrais da adaptação ao estresse é a realocação desta energia para longe de atividades de alta demanda energética, dentre elas o crescimento. Tal dinâmica pode reduzir consideravelmente a capacidade de desempenho do peixe tanto durante um estresse agudo quanto no estresse crônico (Schreck 1990; Kebus et al. 1992; Pankhursk and Kraak 1997; Mommsen et al. 2009).

Além deste aspecto, Blier (2002) sugere que o crescimento pode ser determinado pela disponibilidade de oxigênio para o metabolismo dos tecidos e pela síntese de proteínas. Já é sabido que pesticidas em geral podem interferir na disponibilidade de oxigênio para os tecidos e na síntese de proteínas, como mostram outros estudos (Gimeno 1995; Oruç and Uner 1999; Begum 2004). Neste estudo, os nutrientes provenientes da digestão provavelmente tiveram seu aproveitamento comprometido pela ação do herbicida, uma vez que no grupo controle o peso dos animais foi significativamente maior ao final do experimento, assim como, o comprimento total. Resultados iguais a este trabalho também foram encontrados em estudos feitos por Salbego e Vieira (2005) e Albinati et al. (2009) com peixes expostos ao Glifosato e Roundup, respectivamente.

Na avaliação histopatológica do fígado, os três grupos que foram expostos ao herbicida apresentaram algum grau de alteração no tecido, sendo que as lesões consideradas severas foram hemorragia, vacuolização e hipertrofia dos hepatócitos e presença de melanomacrófagos livres (Figura 1), registradas nos grupos expostos a 0,50 e 0,75g/1000L. Necrose do tecido foi registrada de forma discreta no grupo exposto a 0,75g/1000L (Figura 1). Nos grupos expostos a 0,50 e 0,75g/1000L foi registrada, de forma também discreta, congestão dos sinusóides (Figura 1). Hemorragia, vacuolização dos hepatócitos e presença de melanomacrófagos livres foram registradas de forma moderada no tecido dos peixes expostos a 0,25g/1000L.

Fig 1. Médias do grau de lesões histológicas observadas em cortes de fígado de juvenis de pintados expostos a diferentes concentrações de glifosato após 60 dias de contaminação.

	0,00g/1000L	0,25g/1000L	0,50g/1000L	0,75g/1000L
Necrose	0,02 ^a	0,05 ^a	0,12 ^a	0,75 ^b
Congestão	0,04 ^a	0,09 ^a	0,25 ^a	0,87 ^b
Hemorragia	0,23 ^a	1,25 ^b	2,12 ^c	3,60 ^d
Vacuolização	0,48 ^a	1,87 ^b	3,37 ^c	5,12 ^d
Hipertrofia dos hepatócitos	0,37 ^a	0,87 ^a	2,00 ^b	3,37 ^c
Centro de melanomacrófagos	0,02 ^a	0,12 ^a	0,37 ^a	0,87 ^b
Melanomacrófagos livres	0,50 ^a	1,75 ^b	2,62 ^c	4,00 ^d

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste Dann ($P \leq 0,05$).

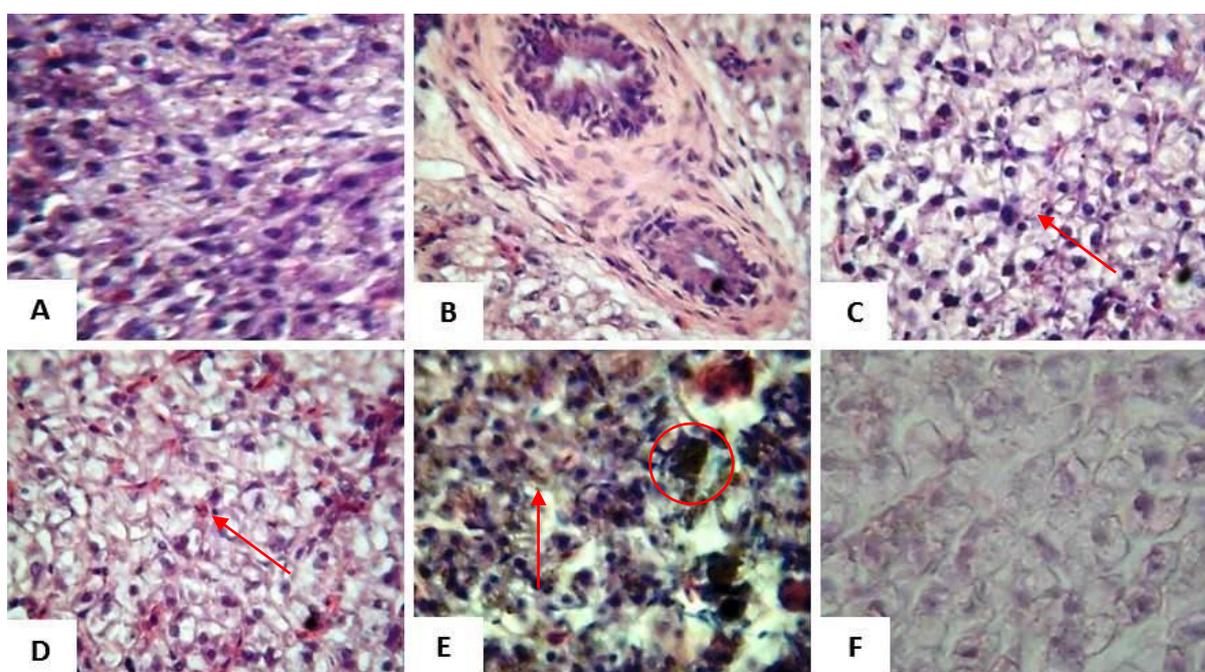


Figura 1: Fotomicrografias do tecido hepático de *Pseudoplatystoma corruscans* expostos ao herbicida Roundup WG® durante 60 dias. (A) tecido hepático de animal do grupo controle, mostrando o arranjo dos hepatócitos (B) ducto biliar do parênquima hepático de animal do grupo controle (C) Hipertrofia e vacuolização (seta) dos hepatócitos do tecido hepático de animal exposto a 0,75g/1000L de água (D) Hemorragia hepática em animal exposto a 0,75g/1000 de água (seta) (E) Centros de melanomacrófagos (círculo) e melanomacrófagos livres (seta) em fígado de animal exposto a 0,75g/1000L de água e (F) necrose focal no tecido hepático de animal do grupo exposto a 0,75g/100L de água. HE, 400X.

Em estudo realizado por Jiraungkoorskul et al. (2002) com tilápias expostas ao Roundup® a 36 ppm, foram observadas alterações hepáticas como hipertrofia, vacuolização dos hepatócitos, degeneração e necrose do tecido. Congestão, hipertrofia dos hepatócitos e vacuolização foram alterações encontradas por Henares et al (2008) em *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nylo) expostos ao herbicida Diquat. Em estudo com trutas-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a 1,3µg/L de Endosulfan durante 21 dias foram registradas hipertrofia dos hepatócitos, necrose, desarranjo cordonal dos hepatócitos, centros de melanomacrófagos e

melanomacrófagos livres no fígado dos animais (Altinok and Capkin 2007). Albinati et al (2009) registraram congestão, hemorragia e necrose no fígado de piaçu expostos a 7,5ppm de Roundup. Segundo Filho et al (2014) as principais alterações encontradas em fígado de peixes são vacuolização, hipertrofia dos hepatócitos, aumento da frequência de melanomacrófagos e congestão, o que confirma os resultados deste trabalho.

Os hepatócitos são células uninucleadas com forma poligonal que possuem importantes funções metabólicas. A hipertrofia destas células pode estar relacionada com aumento do número de organelas responsáveis pela detoxicação e é uma fase reversível ou transitória. O aumento das células hepáticas reflete o seu estado funcional fisiológico, podendo apresentar-se em estado hiperfuncional, onde há aumento do volume celular em decorrência do aumento do metabolismo, ou hipofuncional, onde ocorre diminuição do volume celular (Lins et al. 2010).

O fígado é um órgão sensível às intoxicações e alterações metabólicas. Alterações como vacuolização dos hepatócitos podem ser interpretadas como respostas ao estresse ambiental, sendo consideradas indicadoras histopatológicas da qualidade do ambiente (Thomas 1990; Teh et al. 1997). A vacuolização pode estar relacionada também com um maior acúmulo de glicogênio no fígado. Em peixes, embora os hepatócitos geralmente estejam cheios de glicogênio ou gordura neutra, se a alimentação for suficiente, durante a fase de resposta ao estresse pode ocorrer uma mobilização de glicogênio hepático para atender às necessidades energéticas do organismo, que por sua vez aumentam em condições de estresse (Heath 1995; Oliveira et al. 2010).

Alterações como congestão, hemorragias e necroses estão relacionadas aos processos de intoxicação, sendo que a extensão e gravidade da lesão são proporcionais ao tipo, duração, severidade e estado fisiológico da célula envolvida (Robbins and Cotran 2005). O fígado dos peixes é especialmente sensível à ação de produtos químicos devido à lentidão do fluxo sanguíneo. Assim sendo, os elementos tóxicos que chegam ao fígado pela corrente sanguínea exercem seus efeitos nos hepatócitos por maior tempo do que o fariam em mamíferos (Campos 2008). A congestão é uma lesão que apesar de causar danos na função do tecido, pode ser reversível em caso de melhora da qualidade da água ou progressiva em casos de persistência ao contaminante. Alterações como necrose, são processos nos quais há redução ou perda funcional do órgão, portanto, irreversíveis (Neskovic et al. 1996).

A presença de centro de melanomacrófagos no parênquima hepático pode estar relacionada com a presença de agentes químicos no organismo (Rabito et al. 2006; Leknes 2007; Mela et al. 2007; Hinton 2008). Acredita-se que os centros de melanomacrófagos acumulam pigmentos como melanina em seu interior. Níveis elevados de melanina livre, provenientes da ruptura dos melanomacrófagos, pode ter efeito protetor contra poluentes, uma vez que este composto pode absorver ou neutralizar os radicais livres derivados da degradação de material fagocitado e, assim, proteger o organismo contra danos celulares (Agius and Roberts 2003). Mela (2007) sugere que os melanomacrófagos livres possuem uma tendência a se agregarem formando os centros de melanomacrófagos, portanto, supõe-se que com um maior tempo de exposição ocorreria a formação de um número também maior de centros de melanomacrófagos. Sendo assim, os resultados deste estudo sugerem que os peixes sofreram a ação do herbicida, uma vez que estimulou respostas dos melanomacrófagos, justificando assim, sua presença no fígado.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o herbicida Roundup WG[®] promove alterações biométricas e histológicas importantes em *Pseudoplatystoma corruscans*.

Embora as alterações tenham ocorrido com maior frequência nos animais expostos à maior concentração do herbicida, mesmo quando o nível de contaminação foi abaixo do limite máximo permitido de glifosato para águas, os animais apresentaram algum tipo de interferência em processos fundamentais para a manutenção da sua homeostase corporal.

Portanto, sugerimos realizar mais estudos toxicológicos com outras espécies e outros produtos comerciais formulados a base de glifosato para que sirvam como subsídio para uma possível reavaliação toxicológica de herbicidas formulados a partir deste composto.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação Graduação em Biologia Comparada, ao Laboratório de Ecologia Energética da Universidade Estadual de Maringá, ao Laboratório de Morfofisiologia Animal da Universidade Paranaense, ao NUPELIA e a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

Agius CE, Roberts RJ (2003) Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *Journal of Fish Disease* 26: 499-509.

Albinati ACL, Moreira ELT, Albinati RCB, Carvalho JV, De Lira AD, Santos GB, Vidal LVO (2009) Biomarcadores histológicos – toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 61: 621-627.

Altinok I, Capkin E (2007) Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. *Toxicol Pathol* 35(3): 405-10.

Begun G (2004) Carbofuran insecticide induced biochemical alteration in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. *Aquatic Toxicology* 66: 83-92.

Blier PU (2002) Is the growth of fish set by digestive enzymes or metabolic capacity if the tissues? Insight from transgenic coho salmon. *Aquaculture* 209: 379-384.

Campos CM, Moraes JRE, Moraes FR (2008) Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17: 200-205.

Costa CR, Olivi P (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de Avaliação. *Química Nova* 31: 1820-1830.

Filho FMS, Rezende KFO, Emerenciano AK, Moreira LM, Vila VB, Borges RM, Pressinotti LN (2014) Avaliação de Biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante de mancha urbana. *Atas de Saúde Ambiental* 2: 9-22.

Galli AJB, Montezuma MC (2005) Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. Monsanto, Editora: ACADCOM.

Gimeno L (1995) Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31: 153-157.

Grisolia CK (2005) Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 392 p.

Grützmacher DD (2008) Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no Sul do Brasil. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* 12: 632-637.

Heath AG (1995) Water pollution and fish physiology. 2 ed. Florida: CRC Press, 384p.

Henares MNP, Cruz C, Gomes GR, Pitelli RA, Machado MRF (2008) Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci Biol Sci* 30: 77-82.

Hesketh N, Jones MN, Tipping E (2006) The interaction of some pesticides and herbicides with humic substances. *Anal. Chim. Acta.* 327: 191-201.

Hinton DE, Baumann PC, Gardner, GR, Hawkins WE, Hendricks JD, Murchelano RA, Okirino MS (1992) Histopathology biomarkers. In: Hugget TJ, Kimerle RA, Mehrle Jr., PM, Bergaman HL. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress. Florida: Lewis, p. 155-209.

Hinton DE (2008) Liver toxicity. Em: Di Giulio RT, Hinton DE. (Eds). Toxicology of fishes. D.E. USA: CRC press. p. 327-400.

Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M (2002) Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci. Asia* 28: 121-127.

Kavitha C (2012) Toxicity of Moringa oleífera seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Exp. Toxicol. Pathol.* 67: 681-687.

Kebusmj, Collins MT, Brownfield MS, Kayes TB, Malison JA (1992) Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. *J Aquatic Anim Hlth*, 4: 1-6.

Langiano VC, Martinez CBR (2008) Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Phys C* 147: 222-231.

Leknes IL (2007) Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). *Acta Histochemica* 109: 164-168.

Lins JAPN, Kirschnik PG, Queiroz VS, Cirio SM (2010) Uso de peixes como bioindicadores para monitoramento ambiental aquático. *Ver. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.* 8: 469-484.

Londres F (2011) Agrotóxicos no Brasil: um guia para a ação e defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA.

- Luna LG (1968) Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3.ed. New York : McGraw Hill, 258p.
- Maduenho LP, Martinez CBR (2008) Acute effects of diflubenzuron on the fresh water fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Phys C 148: 265-272.
- Mela M, Randi MAF, Ventura DF, Carvalho CEV, Pelletier E, Ribeiro CA (2007) Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 71: 112-118.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. 2009. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev Fish Biol Fisheries 9: 211-268.
- Munshi JSD, Dutta GR, Singh NK, Adhikari S, Richmonds CR (1996) Age related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity of *Heteropneustes fossilis* (Bloch) by malathion Comp. Biochem. Physiol 111: 331-334.
- Neskovic NK, Poleksic V, Elezovic I, Karan V, Budimir M (1996) Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio*. Environ. Contam. Toxicol. 56: 295-302.
- Oliveira RHF, Silva EMP, Bueno RS E Barone, AAC (2010) O extrato de maracujá sobre a morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo. Ciência Rural 40: 2562-2567.
- Oruç EO, Uner N (1999) Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carborydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. Environ. Pollut. 105: 267-272.
- Pankhursks N E Kraak G (1997) Effects of stress on reproduction and growth of fish. Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: Cambridge University Press, 278p.
- Rabito IS, Costa JRMA, Assis HCS, Pallatier É, Akaishi FM, Anjos A, Randi MAF, Ribeiro CO (2005) Effects of dietary PB (II) and tributyltin on tropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. Ecotoxicology Environmental Safety 60: 147-156.
- Rand GM, Petrocelli SR (1985) Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and Applications, Washington, Hemisphere Publishing, 666p.
- Robbins S, Cotran RS (2005) Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Em: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (Eds) Elsevier: Rio de Janeiro, 1592p.
- Sanches SM (2003) Pesticidas e seus respectivos riscos associados a contaminação da água. Pesticidas: Rev. Ecotox. Meio Ambiente 13: 53-58.
- Schreck CB (1990) Physiological, behavioural, and performance indicators of stress. Am Fish Soc Symp. 8: 29-37.
- Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Tribskorn R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov. 6: 75-86.

Silva JM, Santos JR (2007) Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 11: 565-573.

Tauchert E (2006) Degradação de espécies organocloradas por processos avançados envolvendo ferro metálico. Dissertação, Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR.

Tavares MD, Moraes FR (2004) Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: USP, 144p.

Teh SJ, Adams SM, Hinton DE (1997) Histopathological biomarkers in feral freshwater fish water fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam 37: 51-70.

Thomas P (1990) Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. *American Fisheries Society Symposium*, Bethesda, v. 8: 9-28.