



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

KAMILLA PEREIRA DA SILVA

**USO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS AGUDOS
DA EXPOSIÇÃO DE HERBICIDA COMERCIAL EM PEIXE NEOTROPICAL,
*Piaractus brachypomus***

Araguaína-TO
2020

KAMILLA PEREIRA DA SILVA

**USO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS AGUDOS
DA EXPOSIÇÃO DE HERBICIDA COMERCIAL EM PEIXE NEOTROPICAL,
*Piaractus brachypomus***

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

Orientador: Prof. Dr. Sandro Estevan Moron
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino.

Araguaína-TO
2020

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

S586u Silva, Kamilla Pereira.
USO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS AGUDOS DA EXPOSIÇÃO DE HERBICIDA COMERCIAL EM PEIXE NEOTROPICAL, *Piaractus brachypomus*. / Kamilla Pereira Silva. – Araguaína, TO, 2020.
90 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2020.

Orientador: Sandro Estevan Moron

Coorientador: Marcelo Gustavo Paulino

1. Biomarcadores. 2. Herbicidas. 3. Pirapitinga . 4. Ecotoxicidade.
I. Título

CDD 636.089

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

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

KAMILLA PEREIRA DA SILVA

**USO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
AGUDOS DA EXPOSIÇÃO DE HERBICIDA COMERCIAL EM PEIXE
NEOTROPICAL, *Piaractus brachypomus***

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

Data da aprovação: 11/12/2020

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Sandro Estevan Moron (Orientador-UFT)



Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova (Examinador-UFT)



Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (Examinadora- UFSCar)

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a Deus por ter me dado proteção, capacidade e força durante toda minha trajetória.

Agradeço de todo o meu coração, aos cuidados dos meus pais, Manoel e Marinalva, em especial a minha querida mãe que sempre foi meu alicerce, que segurou minha mão desde os meus primeiros passos e até hoje me ensina a caminhar. É o motivo por eu nunca ter desistido, a quem dedico todas as minhas conquistas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sandro Estevan Moron pelo apoio e desenvolvimento do projeto, mas principalmente por todos os conselhos e incentivos que, sem dúvidas, me fizeram chegar até aqui. Obrigada pela oportunidade de fazer parte da sua equipe e pela fé no meu potencial.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcelo Gustavo Paulino por toda sua paciência, dedicação e carisma que guardarei sempre comigo. É um exemplo de profissional e, com certeza, jamais chegaria aqui sem seus ensinamentos! Muito obrigada por ter feito tanto por mim e por ter acreditado na minha capacidade, isso foi essencial para o meu crescimento.

Grata ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos pela oportunidade e a CAPES pela bolsa de pesquisa e a PROGRAD pelo apoio.

À banca examinadora: Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova e Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes.

Agradeço novamente à Dra. Marisa Narciso Fernandes e toda sua equipe do Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) da UFSCar, pela oportunidade e colaboração nesse projeto. À Dra. Marise Margareth Sakuragui que disponibilizou seu tempo e conhecimento durante minha permanência na UFSCar, uma pessoa incrível. Obrigada a todos que me acolheram e me auxiliaram nesse período: Letícia, Fabrício, Will, Gustavo e Felipe.

A todos os amigos que conquistei no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais– UFT/Araguaína e também aqueles que me ajudaram durante essa caminhada: Mayara, Dayvid, Eduardo, Bheatriz, Alexia,

Ericsson, José Eduardo, Jonas, Venúcia e Alana. Em especial, agradeço as técnicas do laboratório, Gil e Liana, que sempre me ajudaram, apoiaram e me ensinaram. Passamos bons momentos que lembrarei com muito carinho.

Sou imensamente grata ao William Ferreira, pelo companheirismo e cuidado. Por não me deixar desistir durante as dificuldades. Obrigada por estar ao meu lado sempre e por me ensinar a ser uma pessoa melhor todos os dias.

A todos que de alguma forma, estiveram presentes ao meu lado e torceram por mim, muito obrigada!!!

"A felicidade não se resume na
ausência de problemas, mas sim
na sua capacidade de lidar com eles."

- Albert Einstein

RESUMO

Os herbicidas são defensivos agrícolas direcionados ao controle de plantas daninhas, considerados os pesticidas mais frequentes em águas doces brasileiras. Entre as formulações extensamente utilizadas, estão os herbicidas à base de 2,4-D + picloram que podem promover a contaminação de ambientes aquáticos. O presente estudo avaliou o potencial toxicológico de herbicida comercial à base de 2,4-D + picloram (Norton®) em *Piaractus brachypomus* via utilização de múltiplos biomarcadores. Foi determinada a concentração letal média (CL_{50-96h}) e utilizado biomarcadores neurotóxicos, citogenotóxicos, hematológicos, bioquímicos e morfológicos para avaliar a ação do composto em diferentes tecidos. O resultados demonstraram que a CL_{50-96h} determinada foi de 1,54 g L⁻¹ e os distúrbios comportamentais apresentados incluem a perda do reflexo, espasmos musculares e hiperventilação opercular. Os juvenis foram exposto a concentração subletal de 1,11 g L⁻¹ em sistema estático por 96 horas e entre os efeitos observados, houve a inibição da acetilcolinesterase no músculo, indicando distúrbio no sistema neuromuscular. Os parâmetros hematológicos indicaram quadro de anemia macrocítica como provável resposta compensatória para manter o transporte de oxigênio adequado. Não houve aumento na frequência de micronúcleos, entretanto, a exposição promoveu aumento de anomalias nucleares, sugerindo efeitos citogenotóxicos. Os biomarcadores de hepatotoxicidade mostraram inibição da atividade da fosfatase alcalina, indicando que a exposição pode ter gerado mudanças na membrana dos hepatócitos. A morfologia hepática exibiu patologias, como alteração da arquitetura, atrofia e alterações nucleares. As mudanças nos intermediários metabólicos como glicose plasmática e glicogênio muscular, evidenciaram disfunção no metabolismo de carboidratos. As lesões branquiais incluíram constrição do sistema de células pilares e hipertrofia do epitélio lamelar, demonstrando ajustes fisiológicos para conservação das funções, das quais mantiveram a função excretora. Nos rins, foi verificado lesões morfológicas individuais como alterações da arquitetura renal e celular, capazes de ocasionar prejuízos associados à capacidade de reabsorção tubular. A via de biotransformação analisada e a peroxidação lipídica, mostraram que o composto não prejudicou a capacidade de detoxificação do sistema de defesa antioxidante e não houve efeitos elevados do estresse oxidativo. Em conclusão, os resultados evidenciaram que o herbicida comercial promoveu alterações morfofisiológicas nos tecidos em *P. brachypomus*, demonstrando que os efeitos podem comprometer a saúde do animal.

Palavras-chave: Histopatologia, neurotoxicidade, teleósteo, danos morfofisiológicos.

ABSTRACT

Herbicides are agricultural pesticides directed at weeds control, considered the most frequent pesticides in Brazilian fresh waters. The 2,4-D + picloram-based herbicides are among the widely used formulations, which might promote contamination of aquatic environments. This study evaluated the toxicological potential of commercial herbicide 2,4-D + picloram-based (Norton®) *Piaractus brachypomus* using multi-biomarkers. Median-lethal concentration (LC_{50-96h}) was determined and neurotoxic, cytogenotoxic, hematological, biochemical and morphological biomarkers were used to evaluate the effects of the compound in different tissues. The results showed that the determined LC_{50-96h} was 1.54 g L⁻¹ and the behavioral disorders presented include loss of reflex, muscle spasms and opercular hyperventilation. The juveniles were exposed to a sublethal concentration of 1.11 g L⁻¹ in a static system for 96 hours and the observed effects showed the inhibition of acetylcholinesterase in the muscle, indicating a disturbance in the neuromuscular system. The haematological examinations indicated macrocytic anemia, probably a compensatory response to maintain adequate oxygen transport. There was no increase in micronuclei frequency, however, the exposure promoted an increase in nuclear anomalies, suggesting cytogenotoxic effects. The hepatotoxicity biomarkers showed inhibition of alkaline phosphatase activity, indicating that exposure may have caused changes in the hepatocyte membrane. Liver morphology exhibited pathologies, such as architecture and cellular alteration, atrophy and nuclear alterations. Changes in metabolic intermediates, in rate of plasma glucose and muscle glycogen, showed dysfunction in carbohydrate metabolism. Lesions in the gills included constriction of the pillar cell system and hypertrophy of the lamellar epithelium, demonstrating physiological adjustments to preserve the functions, of which they maintained the excretory function. In the kidneys, individual morphological lesions were observed, such as architecture and cellular alteration, capable of causing losses associated with the tubular resorption capacity. The biotransformation system and lipid peroxidation indicate that the herbicide did not impair the detoxification capacity of the antioxidant defense system and there were no elevated effects of oxidative stress. In conclusion, the results showed that the commercial herbicide promoted morphophysiological changes in the tissues in *P. brachypomus*, demonstrating that the effects can compromise the animal's health.

Keywords: Histopathology, neurotoxicity, teleostei, morphophysiological damage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Fórmula estrutural dos herbicidas 2,4-D (A) e Picloram (B). 18
- Figura 2. Esquema das vias de contaminação de agrotóxicos aos corpos d'água.
..... 20
- Figura 3- Formação de MN por efeito aneugênico (A) e clastogênico (B) em célula mononucleada. 24
- Figura 4- Exemplar de *Piaractus brachypomus*. 29

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *Piaractus brachypomus* expostos a concentração subletal de herbicida Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) cérebro (B) e músculo. Os valores são médias (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. 48
- Figura 2 Micronúcleo e anormalidades nucleares encontradas em eritrócitos de *Piaractus brachypomus* expostos ao herbicida Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) Micronúcleo (seta preta contínua); (B) Núcleo vacuolado (seta preta tracejada). (C) Núcleo lobulado (cabeça de seta preta); núcleo em bolha (seta vermelha contínua); núcleo reniforme (seta vermelha tracejada). (D) núcleo entalhado (setas pretas finas); núcleo segmentado (cabeça de seta vermelha) e binucleado (asterisco). Trombócito (T); linfócito (L). Coloração: Giemsa 5%. Escala 10 μ m. 51

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Atividades da aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase ácida (FAC) e fosfatase alcalina (FAL) no plasma de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. Os valores são médios (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. 71
- Figura 2 Histopatologias representativas no rim de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) Controle. (B - D) rim de peixes expostos ao herbicida. Observe as alterações nucleares da célula tubular (cabeça de seta), atrofia do túbulo (círculo), desorganização tubular (seta); degenerações dos túbulos (*) e hipertrofia do túbulo (seta tracejada). G= glomérulo; TR= túbulos renais. Barra de escala= 20 μ m. 73

Figura 3 Histopatologias representativas no fígado de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) Controle. (B - D) fígado de peixes expostos ao herbicida. Observe a alteração da arquitetura hepática com alteração nuclear (seta), atrofia dos hepatócitos (cabeça de seta) e hipertrofia nuclear (círculo) em B. Degeneração celular (seta), inclusões (seta pontilhada) e vacuolização (cabeça de seta) citoplasmáticas em C. Observe as alterações nucleares (seta pontilhadas), atrofia dos hepatócitos (cabeça de seta) e degeneração celular (seta) em D. DB= Ducto biliar; E= eritrócito; H= hepatócito e S= sinusoides. Barra de escala= 20 µm..... 74

Figura 4 Histopatologias representativas nas brânquias de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) Controle. (B - D) Brânquia de peixes expostos ao Norton. Observe a constrição de células pilares (seta), congestão lamelar (*) e ruptura do epitélio (cabeça de seta) em B; hiperplasia (seta) em C; descolamento de epitélio (cabeça de seta) e hipertrofia celular (setas) em D. E= eritrócito; L= lamela; CP= células pilares; CC= célula cloreto. Barra de escala= 20 µm. 75

Figura 5 Índice de lesão do órgão (Iorg) do rim (A), fígado (B) e brânquias (C) de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 horas. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle..... 77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Concentração letal média (CL_{50-96h}) do herbicida Norton (2,4-D+ Picloram) para o *Piaractus brachypomus*, estimado de acordo com dados de mortalidade após 96 horas de exposição e respectivos níveis de segurança. 47
- Tabela 2 Manifestações comportamentais de *Piaractus brachypomus* expostos ao herbicida Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h durante a determinação da CL_{50-96h} 48
- Tabela 3 Parâmetros hematológicos e contagem leucocitária de *Piaractus brachypomus* expostos ao herbicida Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. Os valores são médias (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. 49
- Tabela 4 Valores médios (\pm E.P.M.) da frequência de MN e Alterações nucleares eritrocitárias em *Piaractus brachypomus* expostos a concentração do herbicida Norton (2,4-D + picloram). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. 50

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 Concentrações de metabólitos no plasma, fígado, músculo de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. Os valores são médias (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. 72
- Tabela 2 Atividades da enzima antioxidante GST e níveis de glutathiona (GSH) e peroxidação lipídica no fígado, brânquias e rim de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. 72
- Tabela 3 Índice de alteração individual (Ialt) de histopatologias encontradas em rim, fígado e brânquias de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. 76

LISTA DE ABREVIATÓES

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas

AChE = Acetilcolinesterase

ADAPAR= Agência de Defesa Agropecuária do Paraná.

ALT = Alanina-aminotransferase

ANEs= Anomalias nucleares eritrocitárias

ANVISA = Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AST = Aspartato-aminotransferase

CEUA= Comitê de Ética de Uso de Animais

CGE= Célula granulocítica especial

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média

CL₅₀= Concentração letal média

CNPq = Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

E.P.M. = Erro padrão da média

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMVZ- Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia de Araguaína

EROs = Espécies reativas de oxigênio

FAC = Fosfatases ácidas

FAL = Fosfatases alcalinas

Fi = Fator de importância

g L⁻¹= Grama por litro

GSH = Glutathione

GST = Glutathione S-transferases

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

Hb = Hemoglobina

HCM = Hemoglobina corpuscular média

Hct = Hematócrito

I_{ait} = Índice de alteração individual do órgão

I_{org} = Índice de lesão no órgão

kg = Quilogramas

LPO = Peroxidação lipídica

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg L⁻¹ = Miligrama por litro

MN = Micronúcleo

O₂ = Radicais superóxido

OD = Oxigênio dissolvido

OH = Radical hidroxil

pH = Potencial Hidrogeniônico

ppm = Partículas por milhões

RBC = Red blood cells – Eritrócito

Sc = Escore

UFT = Universidade Federal do Tocantins

VCM = Volume corpuscular médio

Picloram = Ácido 4-amino 3,5,6 tricloro-2-piridinacarboxílico

2,4-D= 2,4-diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- Introdução geral

1 Introdução.....	18
1.1 O uso de herbicidas no Brasil.....	18
1.2 Contaminação de ambientes aquáticos por herbicidas.	20
1.3 Avaliações de toxicidade em estudos ecotoxicológicos.	21
1.4 A espécie <i>Piaractus brachypomus</i> (Cuvier, 1818)	28
2 Objetivos	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
Referências	31

CAPÍTULO 2- Herbicida à base de 2,4-D + Picloram induz toxicidade aguda com efeitos genotóxicos, na atividade da acetilcolinesterase e nos parâmetros hematológicos do peixe Neotropical, *Piaractus brachypomus*

Resumo	41
1. Introdução.....	42
2. Materiais e métodos	43
2.1. Peixe	43
2.3 Teste de toxicidade aguda.....	44
2.4 Exposição Subletal aguda.....	44
2.5 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	45
2.6 Parâmetros hematológicos.....	45
2.7 Teste de micronúcleo (MN) e anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs) ..	46
2.8 Análise Estatística	46
3. Resultados	47
3.1 Concentração letal média.....	47

3.2 Atividade da Acetilcolinesterase	48
3.3 Parâmetros hematológicos	49
3.4 Micronúcleo e alterações nucleares eritrocitárias	50
4 Discussão	51
5 Conclusão	56
Agradecimentos	57
Referências	57
 CAPÍTULO 3- Alterações morfofuncionais em fígado, brânquias e rim induzidas por herbicida à base de 2,4-D + Picloram em peixe Neotropical, <i>Piaractus brachypomus</i>	
1. Introdução	65
2. Materiais e métodos	67
2.1. Peixe	67
2.2 Delineamento experimental.....	67
2.3 Análises bioquímicas.....	68
2.4 Análises morfológicas	69
2.5 Análises estatísticas	70
3. Resultados	70
3.1 Atividades enzimáticas das fosfatases e transaminases.....	70
3.2 Metabólicos	71
3.3 Sistema de biotransformação GSH-GST e peroxidação lipídica	72
3.4 Análises morfológicas	73
3.4.1 Rim.....	73
3.4.2 Fígado.....	74
3.4.3 Brânquias	75
4 Discussão	77
5 Conclusão	82

Agradecimentos	83
CAPÍTULO 4- Considerações finais	
Considerações finais	84
Referências	86

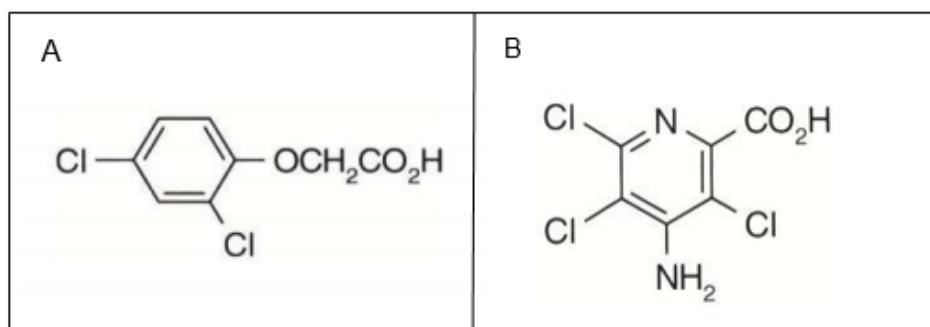
CAPÍTULO 1- Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

1.1 O uso de herbicidas no Brasil

O Brasil alcançou em 2008 o primeiro lugar no ranking mundial de uso de agrotóxicos e desde então tem se mantido entre os principais usuários desse mercado. O uso intensivo de herbicidas é responsável por grande parte desse volume (RIGOTTO; VASCONSELOS; ROCHA, 2014; ANVISA, 2019). Entre os herbicidas comerciais seletivos e sistêmicos de pós-emergência, indicados para o controle de plantas daninhas e dicotiledôneas de porte arbóreo, arbustivo e subarbustivo, destacam-se os que são formulados à base dos ingredientes ativos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + ácido 4-amino 3,5,6 triclora-2-piridinacarboxílico (picloram) (Figura 1). Além dos princípios ativos, são adicionados substâncias inertes denominadas surfactantes (ADAPAR, 2018). É comum a inclusão de substâncias coadjuvantes em herbicidas formulados para assegurar ou potencializar sua eficácia (ROMAN et al., 2007).

Figura 1. Fórmula estrutural dos herbicidas 2,4-D (A) e Picloram (B).



Fonte: Anvisa (2016) ; Anvisa (2020).

A mistura de dois ou mais princípios ativos é recomendado para evitar ou retardar a resistência das ervas daninhas à herbicidas, além de promover redução dos custos econômicos. Desse modo, o picloram aplicado em uma quantidade equivalente as que estão presente nas combinações com 2,4-D, não apresentam controle efetivo de algumas plantas daninhas, assim como o 2,4-D não oferece controle prolongado quando aplicado individualmente. Isso

evidencia que o antagonismo é potencializado pela mistura dos dois compostos (O'SULLIVAN, 1983; KRENCHINSK et al., 2015). A pulverização dessas formulações comerciais combinadas geralmente é feita por via aérea, durante o desenvolvimento das plantas infestantes (ADAPAR, 2018). Com isso, é possível que possa haver a contaminação do ambiente, intensificando efeitos negativos para espécies não-alvo (HOLMBERG, 1975).

O 2,4-D foi o primeiro herbicida seletivo sintetizado e comercializado pela indústria, e tem seu uso atribuído a folhas largas há mais de 70 anos (POKORNY, 1941). Esse composto químico mimetiza as auxínicas naturais, que são hormônios importantes para o crescimento das plantas. Em quantidades alteradas, os hormônios comprometem o crescimento e ocasionam morte celular (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2014). Devido a eficácia e o custo benefício que apresenta, o 2,4-D tem sido utilizado em larga escala e demasiadamente acima do recomendado. Baseado nisso, tem levantado preocupações quanto aos aspectos ambientais, pois a degradação de suas moléculas podem perdurar por muito tempo (DIAS et al., 2011).

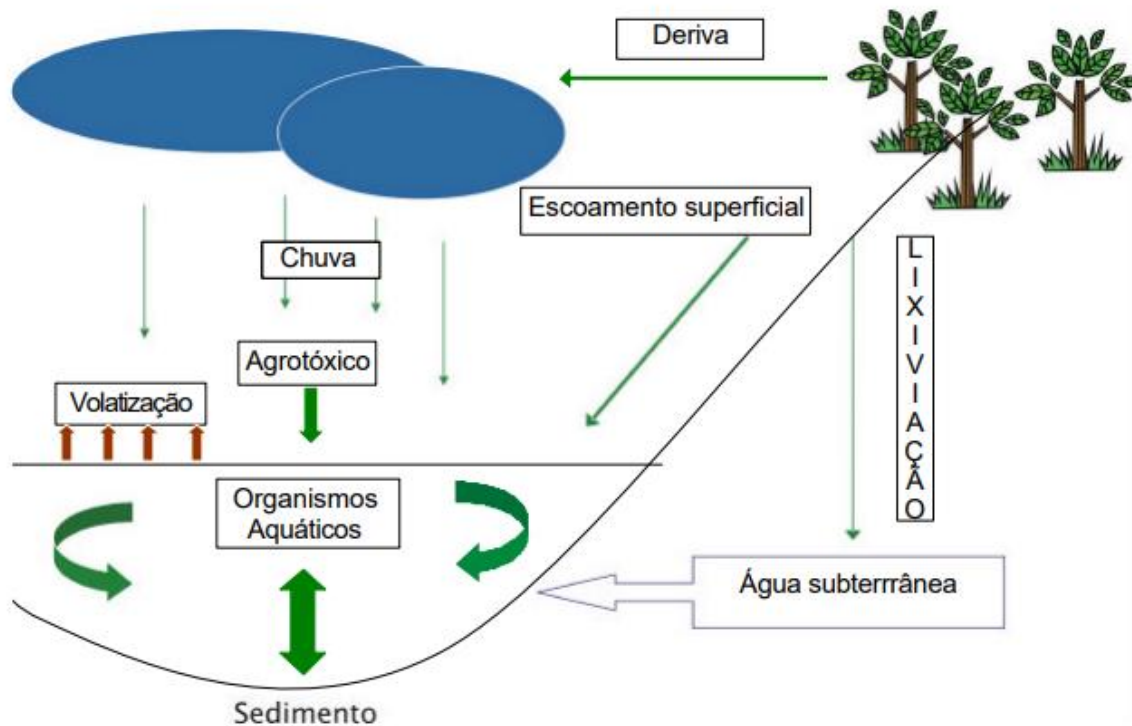
O picloram também integra o grupo de herbicidas auxínicos, sendo capaz de provocar intoxicação em dicotiledôneas de difícil controle (FRANCO et al., 2016). Devido suas características aniônicas e alta solubilidade em água, apresenta baixa adsorção no solo e uma maior rota de dissipação por lixiviação. Portanto, apresenta grande potencial de contaminação de águas subterrâneas (STEFFENS et al., 2015; FRANCESCHI et al., 2019). Uma vez no solo, é lentamente metabolizado por microrganismos e pela fotodegradação, assim, sua meia-vida pode variar entre um mês a três anos dependendo do tipo de solo e condições climáticas (PASSOS et al., 2019).

Os processos que dissipam os agrotóxicos para o meio ambiente são múltiplos, pois dependem de suas propriedades físico-químicas, das características do solo, condições climáticas e ambientais (REBELO; CALDAS, 2014). Durante a pulverização, o produto pode ser desviado e alcançar outros ecossistemas mediante a deriva em decorrência da volatilização, fotodegradação e da sorção (adsorção e absorção) (WAUCHOPE et al. 2002; ORELLANA-GARCÍA et al., 2014; PRUEGER et al., 2017). Dentre as rotas de contaminação, o ambiente aquático geralmente se torna o destino final dos agrotóxicos.

1.2 Contaminação de ambientes aquáticos por herbicidas.

A principal forma de depósito de herbicidas em ecossistemas aquáticos está associada ao escoamento superficial, que é o fluxo de água na superfície do solo, quando submetidos a intensa precipitação, gerando o carregamento de suas moléculas aderidas às partículas do solo (SANTOS; CORREIA; BOTELHO, 2013; SOUSA et al., 2016) (Figura 2). Esses produtos podem ainda alcançar os ambientes aquáticos por algumas rotas, como por exemplo, pela aplicação direta nos corpos d'água para controle de macrófitas competidoras (SESIN et al., 2018). Uma vez aplicado, esses produtos também podem alcançar aos recursos hídricos (águas superficiais e subterrâneas) pelo processo de lixiviação, que é a retirada de sais por dissolução do solo por meio do fluxo de água. Por essa razão, os herbicidas provenientes de pastagem e terras agrícolas podem se mover juntamente com esse fluxo após precipitação ou irrigação (EL ALFY; FARAJ, 2017).

Figura 2. Esquema das vias de contaminação de agrotóxicos aos corpos d'água.



Fonte: TOMITA; BEYRUTH (2002).

Os efeitos adversos causados pela ação direta e indireta das misturas de herbicidas nos ambientes aquáticos, interferem em diferentes níveis de organização biológica, provocando distúrbios na dinâmica das populações bases e o declínio dos níveis primários da cadeia alimentar e, conseqüentemente, resulta em alterações nos níveis tróficos superiores (HASENBEIN; LAWLER; CONNON, 2017). Os impactos em organismos não-alvos reduzem a riqueza de espécies que reflete na perda da biodiversidade, visto que esses contaminantes podem eliminar completamente algumas populações e assim induzir o desequilíbrio desse ecossistema (RELYEA, 2005).

Dentre os efeitos tóxicos provocados em organismos expostos a formulações de 2,4-D + picloram em peixes, observa-se respostas como depleção de energia, diminuição de proteína teciduais e peroxidação lipídica, indicando várias alterações prejudiciais sofridas pelos indivíduos (MENEZES et al., 2014). Os peixes podem acumular pesticidas em concentrações muito maiores do que as encontradas nos ambientes que vivem, devido a aderência desses poluentes na base alimentar que é ingerida por eles (NIMMO, 1985).

Assim, por ser um diverso grupo de vertebrados, as características dos peixes os tornam modelos experimentais para pesquisas ecotoxicológicas, principalmente quando direcionadas a poluentes que oferecem riscos aos sistemas aquáticos. Dessa forma, os estudos utilizam marcadores biológicos em diferentes tecidos desses organismos, para a investigação dos efeitos gerados (YANCHEVA et al., 2015).

1.3 Avaliações de toxicidade em estudos ecotoxicológicos.

Os testes ecotoxicológicos são relevantes no contexto das regulamentações de produtos químicos, pois auxiliam na escolha de políticas apropriadas com base nas respostas que apresentam diante das variáveis ambientais (RUDÉN et al., 2016). A ecotoxicologia avalia as implicações ocasionadas por determinadas concentrações de poluentes naturais ou sintéticos em organismos vivos (TRUHAUT, 1977).

Os testes de toxicidade aguda são ferramentas para analisar os efeitos deletérios que os poluentes provocam nos organismos. Tais testes têm sido utilizados para determinar as implicações que uma substância-teste gera em um

grupo de organismos, submetidos a condições controladas em um curto período de exposição (TOUSSAINT et al., 1995).

Com a finalidade de mensurar os danos causados em organismos aquáticos, os estudos de toxicidade aguda, normalmente determinam a dose letal média (DL₅₀) ou a concentração letal média (CL₅₀), em períodos que variam entre 24 e 96 horas (VIDYA; CHITRA, 2017). As normativas que delimitam essa modalidade de testes, preconizam que o sistema de condução seja estático, semi-estático ou de fluxo contínuo, assim como todas as condições relacionadas ao bem estar animal seja proporcionado de acordo com a singularidade da espécie (OECD, 2019). Portanto, essa modalidade experimental é imprescindível para promover o monitoramento ambiental (DAAM et al., 2019).

Respostas das condições de saúde das espécies e da qualidade do ambiente são realizadas através de análises detalhadas via marcadores biológicos, ou biomarcadores (ARAÚJO et al., 2018). Essas avaliações são utilizadas para indicar os efeitos deletéricos provocados por substâncias exógenas em amostras biológicas, pois sinalizam o produto decorrente da interatividade de um organismo com agentes xenobióticos (GOLDSTEIN; GIBSON; HENDERSON, 1987). Desse modo, os biomarcadores são ferramentas úteis na quantificação de reações causados por agrotóxicos, possibilitando a mensuração das respostas adaptativas nos variados parâmetros biológicos (DEY et al., 2016). Em estudos ecotoxicológicos, recomenda-se o uso de diferentes biomarcadores, para assim, contribuírem para uma avaliação geral das respostas e diminuir a imprecisão diante da variabilidade inerente dos biomarcadores apresentados de forma individual (BAUDOU et al., 2019).

Os biomarcadores fisiológicos são fundamentais para avaliar as condições funcionais de organismos aquáticos frente a xenobióticos (SAMANTA et al., 2017). Os parâmetros eritrocitários são úteis para a análise da resposta fisiológica desencadeada, por isso, é necessário a quantificação da concentração de hemoglobina (Hb), de eritrócitos (RBC- *Red blood cells*) e hematócrito (Hct), bem como os índices hematimétricos, que referem-se ao tamanho e a distribuição da hemoglobina, sendo eles o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). A partir desses atributos, mudanças hematológicas detectadas nos peixes são consideradas importantes para

analisar os efeitos dos contaminantes, pois esses parâmetros são capazes de apresentar variações mesmo submetidos a baixas doses de exposição (VENTURA; CORSINI; GABRIEL, 2015; BURGOS-ACEVES, et al., 2018).

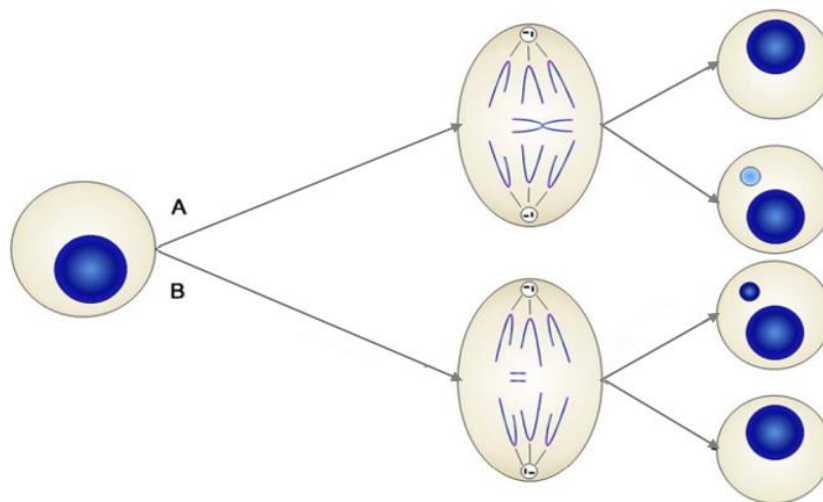
A contagem diferencial de leucócitos circulantes no sangue está entre os parâmetros hematológicos mais utilizados, pois desempenham funções imunológicas e auxiliam na descrição das exigências homeostáticas (RORIZ et al., 2015). Dentre os principais leucócitos atuantes na defesa do indivíduo, os neutrófilos são as fagócitos essenciais contra infecções, os monócitos são células migratórias que vão até o foco inflamatório, enquanto os linfócitos desempenham uma resposta imune após o reconhecimento de antígenos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; HAVIXBECK; BARREDA, 2015).

A série eritrocitária ainda pode ser utilizada como bioindicadores genotóxicos e mutagênicos. Os agentes genotóxicos são aqueles que podem interagir com o DNA e com os cromossomos, provocando mudanças nas estruturas celulares que geram mutações gênicas. Os danos são avaliados como irreversíveis e são mantidos nas gerações seguintes, aumentando a incidência de doenças hereditárias que podem provocar redução na riqueza de espécies (SHAH et al., 2020). Os eritrócitos de peixes são comumente utilizados para esse teste, devido serem células nucleadas e evidenciam facilmente qualquer lesão associadas aos herbicidas (MORON et al., 2006). Os biomarcadores genéticos são meios de detectar a presença de substâncias mutagênicas por intermédio dos danos no material genético, e um desses métodos de análise realizado em peixes é o teste de micronúcleos (MN) (HEMALATHA et al., 2020).

Os MN (Figura 3) são massas que possuem cromatinas citoplasmáticas, derivados a partir da segregação cromossômica anormal (efeito aneugênicos) e da quebra de cromossomos (efeito clastogênicos) e não são transportados pelas fibras do fuso para os pólos durante a anáfase. Por isso, não se ligam aos núcleos das células filhas após a divisão celular e tornam-se visíveis como um núcleo pequeno e separado do núcleo principal (SCHMID, 1975; AL-SABTI; METCALFE, 1995). As alterações no material genético dos eritrócitos podem ocasionar diferentes irregularidades no aspecto morfológico do núcleo em razão de atraso de material durante a mitose. Devido a isso, outras anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs) (núcleos em bolha, binucleado, lobulado, entalhado, vacuolado, reniforme e segmentado) são consideradas

complementares na análise de micronúcleo, sendo biomarcadores de alta sensibilidade que indicam o potencial citotóxico e genotóxico de pesticidas, sejam esses compostos avaliados de forma individual ou em formulações associadas (HUSSAIN et al., 2018).

Figura 3- Formação de MN por efeito aneugênico (A) e clastogênico (B) em célula mononucleada.



Fonte: Adaptado e modificado de Terradas et al. (2010).

As respostas adaptativas ao estresse são consideradas mecanismos essenciais para manter a estabilidade molecular e fisiológica do peixe, de modo que seja mantida a homeostase (BALASCH; TORT, 2019). Dentre as principais modificações induzidas por estresse em peixes incluem a concentração de amônia e glicose plasmáticas, os níveis de glicogênio hepático e muscular e o catabolismo das proteínas teciduais (MENEZES, 2014; MAJUMDER; KAVIRAJ, 2018; BAUDOU et al., 2019), todos envolvidos em mobilização energética para detoxicação e sobrevivência.

Por essa razão, o fígado é um órgão que apresenta função vital para o organismo e é um excelente indicador de toxicidade em peixes, pois juntamente com o músculo, comportam as maiores reservas de glicogênio, que são destinadas à atender as demandas energéticas. Essa forma de armazenamento de energia no fígado (glicogênio), trata-se de um estoque emergencial utilizado em adaptações bioquímicas em situações de estresse (CYRINO et al., 2000).

O fígado é um órgão que pode sofrer disfunções em consequência da

ação de contaminantes. As lesões sofridas nesse tecido, podem alterar a concentração das enzimas metabólicas de função hepática, como a aspartato aminotransferase (AST), a alanina aminotransferase (ALT), as fosfatases ácidas (FAC) e fosfatases alcalinas (FAC). Tais enzimas apresenta grande utilidade como biomarcadores de dano hepático, pois além de suas funções metabólicas intracelulares, são liberadas e encontradas na corrente sanguínea em decorrência de injúrias e lesões nos tecidos (AMACHER, 2002; GHELICHPOUR et al., 2017).

Além da mobilização energética, o processo de biotransformação de xenobióticos abrange sistemas enzimáticos que visam a eliminação desses compostos do organismo, que podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como os radicais superóxido (O_2^\bullet), radical hidroxil (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs podem causar alterações citológicas, pela indução do evento denominado estresse oxidativo, esses danos podem incluir quebras de fita de DNA, inativação de enzimas e apoptose (PEÑA-LLOPIS et al., 2003; BANUDEVI et al., 2006). Vale ressaltar que as EROs são as causas mais comuns de genotoxicidade, nesse caso, pode ser evidenciada por meio da indução de MN e ANEs, reafirmando a importância da aplicação desses biomarcadores (JHA, 2004).

Nos peixes, os sistemas enzimáticos envolvidos no processo de detoxificação, atuam principalmente em órgãos metabolizadores como o fígado, os rins e as brânquias (BAINY et al., 1996). O estresse oxidativo em peixes acometidos por contaminação aquática, são causados por excessos na formação de EROs durante o metabolismo aeróbico da respiração celular e pela insuficiência em realizar as defesas antioxidantes (SAKURAGUI et al., 2019).

Dessa forma, a glutathione S-transferases (GST) faz parte do sistema antioxidante enzimático de biotransformação de xenobióticos e é um excelente biomarcador de poluentes, assim como a glutathione reduzida (GSH) que atua como antioxidantes não enzimáticos. Conjuntamente, evitam o ligamento desses agentes a outras moléculas celulares, como o DNA, além de impedirem danos como a peroxidação lipídica (LPO) (PAULINO et al., 2020).

De modo geral, a GST é considerada a principal enzima da fase II da detoxificação e possui a GSH como co-fator. Nessa fase, caracteriza-se o início da detoxificação, ocorrendo a conjugação do xenobiótico (ou de seus

metabólitos oriundos da fase I) com a GSH, sendo um processo catalisado pela GST. Com isso, o produto resultante dessa conjugação normalmente torna-se mais solúvel em água, além de inativo ou menos tóxicos, podendo posteriormente ser excretado ou metabolizado pela célula (VAN DER OOST, et al., 2003). Entre os vários mecanismos associados à resistência celular a xenobióticos, o sistema enzimático GSH/GSTs é apontado como um dos mais fundamentais para a garantia da sobrevivência de espécies (HUBER et al., 2008).

O início da reação em cadeia denominada LPO, pode ser ocasionada pela presença das espécies reativas de oxigênio geradas a partir da absorção dos contaminantes pelos organismos aquáticos. Assim, os oxidantes promovem a quebra de fosfolipídios de membrana que contém ácidos graxos poli-insaturados, gerando intermediários prejudiciais às células (HALLIWELL; CHIROCO, 1993). Os efeitos da LPO provoca danos severos nas propriedades das membranas celulares, como a redução da fluidez e a destruição da integridade do sistema de membranas e outras consequências que causam injúrias e morte celular. Desse modo, a quantificação de intermediários da LPO, têm sido utilizados como biomarcador de estresse oxidativo (SRIVASTAVA; REDDY, 2017).

Além do fígado, brânquias e rins, outros tecidos são indicadores de toxicidade, como o cérebro e o músculo branco. Estes tecidos são utilizados principalmente como biomarcadores neuroquímicos, podendo fornecer respostas associadas aos efeitos dos contaminantes ambientais (TORRE; FERRARI; SALIBIAN, 2002). A atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e músculo de peixes é bastante utilizado, uma vez que sua função é catalizar a AChE em ácido acético e colina, evitando a propagação contínua de impulsos nervosos, para assim, permitir o funcionamento adequado dos sistemas neuromuscular e sensorial do organismo (STURM; SILVA; HANSEN, 1999; FUKUTO, 1987). Essa enzima é sensível a atuação de grupos químicos de pesticidas e pode ser inibida, gerando problemas nas fibras musculares, paralisias e efeitos que sucedem na morte do animal (BERNAL-REY et al., 2020).

Para a identificação das alterações de caráter morfológicos e estruturais, a histopatologia é amplamente utilizada como um biomarcador morfológico, pois permite que diversos tecidos sejam analisados microscopicamente,

possibilitando uma resposta viável do nível de contaminação diante de efeitos subletais (SHARMA; CHADHA; BORAH, 2018). As alterações histopatológicas decorrem de mudanças fisiológicas e bioquímicas no organismo que resulta em lesões nas células, tecidos e órgãos. Em peixes, esses biomarcadores viabilizam a análise de tecidos que são mais afetados devido a ação dos agentes químicos, geralmente órgãos responsáveis por funções vitais, como as brânquias, fígado e rim (IKISA; BABATUNDE; HART, 2019).

Em geral, as brânquias são órgãos de troca gasosas na maioria dos peixes e, desenvolvem ainda várias outras funções vitais como a osmorregulação, alimentação, equilíbrio ácido-base, metabolismo e excreção de metabólitos nocivos e compostos nitrogenados (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005). Anatomicamente, possuem uma vasta superfície de contato com o ambiente externo e sua eficácia no transporte dos gases respiratórios depende da integridade de sua organização estrutural. Além disso, o alto teor de perfusão permite a entrada de poluentes (PAULINO; SOUZA; FERNANDES et al., 2012). Desse modo, a morfologia branquial está diretamente relacionada com sua função. As modificações para preservar as funções branquiais diante de mudanças ambientais, evoluem componentes morfológicos ou geram consequências para esse tecido (FERNANDES; MORON, 2020). Assim, as análises histopatológicas em brânquias têm sido um eficaz indicador de danos por contaminação aquática (STRZYZEWSKA; SZAREK; BABINSKA, 2016).

A morfologia do fígado representa toda sua funcionalidade que inclui funções metabólicas, síntese de proteínas plasmáticas, formação de bile, armazenamento de compostos energéticos, remoção de substâncias nocivas no sangue, biotransformação e excreção de xenobióticos (BERNET, et al., 1999). Perante substâncias tóxicas, esse tecido pode gerar alterações histológicas notáveis como mudança na arquitetura hepática, alterações nucleares, hiperplasias, indicativos de inflamações e várias outras. O fígado tem sido alvo de destaque entre os estudos ecotoxicológicos associados à contaminação de peixes, e a histopatologia mostra-se eficaz nas contribuições para esses estudos (PAULINO et al., 2020).

Em peixes, o rim é considerado um órgão alvo dos poluentes em casos de exposição, pois recebem grande fluxo sanguíneo e compõem a principal rota de excreção dos metabólitos derivados dos xenobióticos (CENGIZ, 2006). Esse

órgão em peixes de água doce, elimina produtos químicos durante o curso de formação da urina, por meio da filtração glomerular ou pela reabsorção ou pelos processos de secreção tubular (EVANS, 1993). As características morfológica do rim de teleósteos é marcado pela posição dorsal e por suas divisões em porções anterior e posterior. A porção anterior está integrada ao tecido hematopoiético, tecido linfoide e ao sistema endócrino dirigente das respostas ao estresse. A porção posterior é constituída por néfrons, para a realização da excreção e a manutenção homeostática (MARTINEZ, 2017).

As substâncias nocivas presente no sangue devem ser removidas pela filtração glomerular, entretanto, esses compostos podem se ligar a proteínas plasmáticas e ficarem retidas no glomérulo durante o processo de eliminação (PRITCHARD; BEND, 1984). As lesões renais podem seguir diversos padrões dependendo do agente químico envolvido no processo, por isso, tem se tornado efetivo nos estudos como biomarcador histopatológico em peixes, mesmo que em uma menor frequência se equiparado a outros tecidos (FAHEEM ; JAHAN; LONE, 2018).

1.4 A espécie *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818)

O *Piaractus brachypomus* (Figura 4), popularmente conhecidos como pirapitinga, são nativos rios Amazonas, Solimões, Orinoco e respectivos afluentes (WOYNAROVICH, 1988). São animais pertencentes à ordem Characiformes, Superordem Ostariophysi, família Characidae (URBINATI et al., 2010). O pirapitinga é a única espécie do gênero *Piaractus* encontrada na região Amazônica e é considerado o terceiro maior peixe de escamas dessa bacia, podendo pesar até 20 quilos e alcançar 80 centímetros (RIBEIRO et al, 2016). Essa espécie possui hábitos alimentares onívoros, geralmente alimenta-se principalmente de frutos, sementes, pequenos peixes e microcústáceos. Assim, tem habilidade de digerir tanto alimentos de origem vegetal quanto animal (VÁSQUEZ-TORRES et al., 2002). Pirapitinga é considerada economicamente importante e cada vez mais produzido em pisciculturas, principalmente na produção de híbridos em várias regiões do Brasil (HASHIMOTO et al. 2012).

Figura 4- Exemplar de *Piaractus brachypomus*.



Fonte: Autora, 2020.

A reprodução dessa espécie ocorre em qualquer período do ano, desde que o manejo seja adequado. Apresenta também rápido crescimento e adaptação ao cultivo em tanques, além de alta resistência a doenças, o que proporciona um boa produtividade da carne e grande relevância para o mercado consumidor (BALDISSEROTTO, GOMES, 2005; CHAGAS et al., 2005). Tais características do *P. brachypomus* o torna uma alternativa como bioindicador de alterações ambientais (RORIZ et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial toxicológico em concentração subletal do herbicida à base de 2,4-D + picloram em pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) via integralização de múltiplos biomarcadores.

2.2 Objetivos específicos

- I. Determinar a concentração letal média (CL₅₀) para pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) durante 96 h de exposição;
- II. Avaliar efeitos neurotóxicos do herbicida por meio da atividade da acetilcolinesterase de cérebro e músculo branco de pirapitinga;
- III. Determinar o efeito da exposição aguda de 96 h nas variáveis hematológicas e genotoxicidade em eritrócitos.
- IV. Avaliar o comprometimento morfofuncional do fígado, rim e brânquias, via biomarcadores plasmáticos e histopatológicos.
- V. Avaliar a ativação do sistema enzimático de desintoxicação (GSH/GST) e avaliar o indicativo de aumento de EROs por meio da LPO no fígado, brânquias e rim.

REFERÊNCIAS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mut. Res./Gen. Toxicol.**, v. 343, p. 121–135, 1995.

ADAPAR, Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Registro **ADAPAR/PR N°466**. Agrotóxicos- Herbicida Norton. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=336>> Acesso em: 20 maio 2020.

AMACHER, D.E. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 21, p. 253–262, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública n° 264**, de 04 de novembro de 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3077917/CONSULTA+P%C3%A9BLICA+N+264+GGTOX.pdf/b483e301-4de5-4a5e-8c81-db46eb4e0069>> . Acesso em 14 Abr. 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública n° 798**, de 26 de março de 2020. Disponível em: < <http://www.in.gov.br/web/dou/-/consulta-publica-n-792-de-26-de-marco-de-2020-250636307> > Acesso em: 14 Abr. 2020

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Parecer SEI nº 5/2018, Nota Técnica conclusiva de reavaliação do ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), com as respectivas recomendações e proposta de minuta. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/4340788/Nota+T%C3%A9cnica+Final+2-4D.pdf/a0ef4bb6-db71-42ae-9174-2fa7e2c9b95f>> Acesso em 13 abr. 2020.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**. PARA. Relatório de Atividades de 2010. Gerência Geral de Toxicologia, 2011. Acesso em: dez. 2019.

ARAÚJO, F. G.; MORADO, C. N.; PARENTE, T. T. E.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; GOMES, I. D. Biomarkers and bioindicators of the environmental condition using a fish species (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803) in a tropical reservoir in Southeastern Brazil. **Braz. J. of Bio.**, v. 2, p. 351-359, 2018.

BAINY, A. C. D.; SAITO, E.; CARVALHO, P. S. M.; JUNQUEIRA, V. B. C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aqu. Toxicol.**, v. 34, p. 151–162, 1996.

BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the stress responses in fish. **Front Endocrinol.**, v. 10, p.62, 2019.

BANUDEVI, S.; KRISHNAMOORTHY, G.; VENKATATAMAN, P.; VIGNESH,

C.; ARULDHAS, M.M.; ARUNAKARAN, J. Role of a-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCP exposed male albino rats. **Food Chem. Toxicol.** v. 44, p. 2040– 2046, 2006.

BAUDOU, F.G.; OSSANA, N.A.; CASTAÑÉ, P.M.; MASTRÁNGELO, M.M.; GONZÁLEZ, N. A. A.; PALACIO, M. J.; FERRARI, L. Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. **Sci. of The Total Environ.**, v. 650, p.1779-1786, 2019.

BERNAL-REY, D. L.; CANTERA, C. G.; DOS SANTOS AFONSO, M.; MENÉNDEZ-HELMAN, R. J. Seasonal variations in the dose-response relationship of acetylcholinesterase activity in freshwater fish exposed to chlorpyrifos and glyphosate. **Ecotoxicol. and Environ. Safety**, v. 187, 2020.

BERNET, D.; SCHIMID, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. of Fish Dis.**, p. 25-34, 1999.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins, 2013. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso 07 abril 2020.

BURGOS-ACEVES, M. A.; COHEN, A.; SMITH, Y.; FAGGIO C. MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 148, p. 995– 1000, 2018.

CENGIZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environ. Toxicol. and Pharma.**, v. 22, n. 2, p. 200–204, 2006.

CHAGAS, E. C.; GOMES, L. C.; JÚNIOR, H. M.; ROUBACH, R.; LOURENÇO, J. N. P. Desempenho de tabaqui cultivado em tanques-rede, em lago de várzea, sob diferentes taxas de alimentação. **Pes. Agro. Brasileira**, v.40, n.8, p.833-835, 2005.

CYRINO, J. E. P.; PORTZ, L.; MARTINO, R. C.; Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass” (*Micropterus salmoides*). **Sci. Agrícola**, v. 57, n. 4, p. 609- 616, 2000.

DAAM, M. A.; MOUTINHO, M. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; SCHIESARI, L. Lethal toxicity of the herbicides acetochlor, ametryn, glyphosate and metribuzin to tropical frog larvae. **Ecotoxicol.**, v. 28, p. 707–715, 2019.

DEY, S.; SAMANTA, P.; PAL, S.; MUKHERJEE, A. K.; KOLE, D.; GHOSH, A. R. Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide. **Emer. Contamin.**, v. 2, p. 191–203, 2016.

DIAS, J. R. M.; DUBBERSTEIN, D.; TAVELLA, L. B.; FERREIRA, E.;

STACHIW, R. Lixiviação de 2, 4-D em solo de pastagem na amazônia ocidental. **Agro. Científica no Semi.**, v. 7, p. 15-20, 2011.

EL ALFY, M.; FARAJ, T. Spatial distribution and health risk assessment for ground-water contamination from intensive pesticide use in arid areas. **Environ. Geochem. Health** v. 39, p. 231–253, 2017.

EVANS, D. H. The Physiology of Fish. **Boca Raton**, Flórida. 1993, p. 99-136.

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

FAHEEM, M.; LONE, K. P. Oxidative stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. **Braz. J. of Pharma. Sciences**, v. 53, 2018.

FERNANDES, M. N., MORON, S. E. Breathing and respiratory adaptations. **Bio. and Physi. of Fresh. Neotropical Fish**, cap. 10, 2020, p. 217–250.

FRANCESCHI, M.; ARANTES, S. A.; DO C. M.; ANDRADE, E. A.; ROCHA, A. M.; ARANTES, K. R.; YAMASHITA, O. M. Liming on picloram leaching in dystrophic Red Yellow Latosol. **Revista Bras. de Eng. Agrícola e Ambiental**, v. 23(2), p. 103–108, 2019.

FRANCO, M. H. R.; LEMOS, V. T.; FRANÇA, A. C.; SCHIAVON, N. C.; ALBUQUERQUE, M. T.; ALECRIM, A.O. DE; D'ANTONINO, L. Physiological and morphological characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soil with picloram residues. **Pes. Agro. Tropical**, v. 46, p. 276-283, 2016.

FUKUTO, T. R. Organophosphorus and carbamate esters: the anticholinesterase insecticides. **Agri. Experiment Station, Div. of Agriculture and Natural Res.**, University of California, 1987.

GENTZKOW, C.J.; MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. of Bio. Chem.**, 143: 531-544, 1942.

GHELICHPOUR, M.; TAHERI MIRGHAED, A.; MIRZARGAR, S. S.; JOSHAGHANI, H.; EBRAHIMZADEH MOUSAVI, H. Plasma proteins, hepatic enzymes, thyroid hormones and liver histopathology of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) exposed to an oxadiazin pesticide, indoxacarb. **Aqua. Research**, v. 48, p. 5666–5676, 2017.

GOLDSTEIN, B. GIBSON, J. HENDERSON, R. Biological markers in environmental health research. **Environ. Health Perspect.**, v. 74, p. 3-9, 1987.

HALE, P. A. The morphology and histology of the digestive systems of two freshwater teleosts, *Poecilia reticulata* and *Gasterosteus aculeatus*. **Proc. of the Zoo. Society of London**, v. 146, p. 132–149, 1965.

- HALLIWELL, B.; CHIROCO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and 782 significance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 715–725, 1993.
- HASENBEIN, S. P.; LAWLER, S.; CONNON, R. An Assessment of Direct and Indirect Effects of Two Herbicides on aquatic Communities. **Environ. Toxicol. and Chem.**, v. 36, p. 2234-2244, 2017.
- HASHIMOTO, D.T.; SENHORINI, J.A.; FORESTI F.; PORTO-FORESTI, F. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Rev. in Aqua.**, v. 4, p. 108-118, 2012.
- HAVIXBECK, J. J.; BARREDA, D. R. Neutrophil development, migration, and function in teleost fish. **Biology**, v. 4, p. 715–734, 2015.
- HEMALATHA, D.; NATARAJ, B.; RANGASAMY, B.; MAHARAJAN, K.; RAMESH, M. Exploring the sublethal genotoxic effects of class II organophosphorus insecticide quinalphos on freshwater fish *Cyprinus carpio*. **J. of Ocean. and Limn.**, 2020.
- HIBIYA, T. An atlas of fish histology, normal and pathological features. New York: **Gustav. Fischer. Verlag.**, 1982.
- HOLMBERG, B. Biological aspects of chemical and biological weapons. **Ambio.**, v. 4, p. 211-215, 1975.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos (Glutathione and related enzymes: biological role and importance in pathological processes). **Quím. Nova**, v. 31, p. 1170–1179, 2008.
- HUSSAIN, B., SULTANA, T., SULTANA, S., MASOUD, M.S., AHMED, Z., MAHBOOB, S. Fish eco-genotoxicology: comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi J. Biol. Sci.** v. 25, p. 393-398, 2018.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Total de bovinos, Brasília-DF, 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=rebanho+bovino+nacional>> Acesso em: 12 abr. 2020.
- IKISA, K. G.; BABATUNDE, B. B.; HART, A. I. Histopathological variations in gills, liver and kidney of Nile tilapia - *Oreochromis niloticus* exposed to benzalkoniumchloride mixture with treated produced water. **J. of App. Sci. and Environ. Manag.**, v. 23, p. 1181, 2019.
- JHA, A. N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. *Mutat Res.* v. 552, p. 1–17, 2004.

KRENCHINSKI, F.H.; ALBRECHT, A.J.P.; ALBRECHT, L.P.; CESCO, V.J.S.; RODRIGUES, D.M.; FILHO, R.V. Application rates and herbicide in weed control in pasture. **R. Bras. de Herb.**, v.14, n.4, p.271-279, 2015.

MAJUMDER, R.; KAVIRAJ, A. Acute and sublethal effects of organophosphate insecticide chlorpyrifos on freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Drug and Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 487-495, 2019.

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

MARTINEZ, C. B. R. The Kidney. Staty University of Londina. **Encyclopedia of Fish Physiology**, p. 1411-1418, 2017.

MENEZES, C.; FONSECA, M. B.; LEITEMPERGER, J.; PRETTO, A.; MORAES, B. S.; MURUSSI, C. R.; LORO, V. L. Commercial formulation containing 2,4-D affects biochemical parameters and morphological indices of silver catfish exposed for 90 days. **F. Physiol. and Biochem.**, v. 41, p. 323–330, 2014.

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

NIMMO, D.R. Pesticides. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. **Hemisp.**, p. 335-373, 1985.

OAKES, D.; POLLAK, J. Effects of a herbicide formulation, Tordon 75D®, and its individual components on the oxidative functions of mitochondria. **Toxicol.**, v.136, p. 41–52, 1999.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. **Ac. Toxicity Test**. Effects on Biotic Systems, 2019.

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

ORELLANA-GARCÍA, F.; ÁLVAREZ, M. A.; LÓPEZ-RAMÓN, V.; RIVERA-UTRILLA, J.; SÁNCHEZ-POLO, M.; MOTA, A. J. Photodegradation of herbicides with different chemical natures in aqueous solution by ultraviolet radiation. Effects of operational variables and solution chemistry. **Chem. Eng. J.**, v. 255, p. 307–315, 2014.

O'SULLIVAN, P. A. Influence of Picloram Alone or Plus 2,4-D on Control of Wild Oats (*Avena fatua*) with Four Postemergence Herbicides. **Weed Sci.**, v. 31, p. 889-891, 1983.

PASSOS, A. B. R.; SOUZA, M.F.; SARAIVA, D.T.; DA SILVA, A.A.; QUEIROZ,

M.E.L.; CARVALHO, F.P.; SILVA, D.V. Effects of liming and urochloa brizantha management on leaching potential of picloram. **Water. Air. Soil. Pollut.** v. 230 (1), p.12, 2019.

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

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

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquat. Toxicol.** v. 65, p. 337–36, 2003.

POKORNY, R. Some chlorophenoxyacetic acids. **J. Amer. Chem. Soc.**, v.63, p.1768, 1941.

PRITCHARD, J. B.; BEND, J. R. Mechanisms Controlling the Renal Excretion of Xenobiotics in Fish: Effects of Chemical Structure. **Drug Metab. Rev.**, v. 15, n. 4, p. 655–671, 1984.

PRUEGER, J. H.; ALFIERI, J.; GISH, T. J.; KUSTAS, W. P.; DAUGHTRY, C. S. T.; HATFIELD, J. L.; MCKEE, L. G. Multi-year measurements of field-scale metolachlor volatilization. **Water Air and Soil Pollution**, v. 228, p. 11, 2017.

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

RELYEA, R. A. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. **Ecolog. App.**, v.15, p. 618–627, 2005.

RIBEIRO, F.M.; FREITAS, P.V.D.X.; SANTOS, E.O.; SOUSA, R.M.; CARVALHO, T.A.; ALMEIDA, E.M.; SANTOS, T.O.; COSTA, A.C. Alimentação e nutrição de pirapitinga (*Piaractus brachypomums*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*): Revisão. **Pubvet**, v.10, p. 873-882, 2016.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D.P.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cad. Sau. Publica**, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; PAZMIÑO, D. M.; SPARKES, I.; ROCHETTI, A.; HAWES, C.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; SANDALIO, L. M. 2,4-

Dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics. **J. of Exper. Botany**, v. 65, p. 4783–4793, 2014.

ROMAN, E. E.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M. A.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007, 160p.

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

ROSE, S.C.; CARTER, A. Agrochemical leaching and water contamination. **Conserv. Agri.**, p. 417–424, 2003.

RUDÉN, C.; ADAMS, J.; ÅGERSTRAND, M.; BROCK, T. C. M.; POULSEN, V.; SCHLEKAT, C. E.; WHEELER, J. R.; HENRY, T. R. Assessing the relevance of ecotoxicological studies for regulatory decision making. **Integr. Environ. Assess. Manag.**, v. 13, p. 652- 663, 2016.

RUIZ, A. C. effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*, **Ecotox. Environ. Safe.**, p. 222-229, 2016.

SAKURAGUI, M. M.; PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; TAVARES, D.; TEREZANB, A. P.; PESENTIC, E.; GIANID, A.; FERNANDES, J. B.; CESTARIC, M. M.; FERNANDES, M. N. Crude extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* strain R28 induces anemia and oxidative stress in fish erythrocytes. **Toxicon.**, v. 169, p.18–24, 2019.

SAMANTA, P.; PAL, S.; MUKHERJEE, A. K.; SENAPATI, T.; JUNG, J.; GHOSH, A. R. Multi-level Integrative Biomarker Responses in Freshwater Teleostean Fishes Exposed to Almix Herbicide. **Inter. J. of Environ. Res.**, v. 11, p. 475–487, 2017.

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

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutat. Res.**, v. 31, no. 1, p. 9-15, 1975.

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

SHAH, N.; KHAN, A.; HABIB, N. K.; KHISROON, M. Genotoxic Consequences in Common Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella* Valenciennes, 1844) Exposed to Selected Toxic Metals. **Bio. Trace Element Res.**, 2020.

SHARMA, M.; P. CHADHA, BORAH, M.K. Histological alterations induced by 4-nonylphenol in different organs of fish, *Channa punctatus* after acute and sub chronic exposure. **J. Entomol. Zool. Stud.**, v. 6, p. 492-499, 2018.

SOUSA, A. S.; DUAVÍ, W. C.; CAVALCANTE, R. M.; MILHOME MAL, DO NASCIMENTO RF. Estimated levels of environmental contamination and health risk assessment for herbicides and insecticides in surface water of Ceará, Brazil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 96, p. 90–95, 2016.

SRIVASTAVA, B.; REDDY, P. B. Lipid peroxidation and DNA damage as biomarkers of pollution induced oxidative stress in fish. **Life Sci. Int. J.**, v. 4(1), p. 194-198, 2017.

STEFFENS, K.; JARVIS, N.; LEWAN, E.; LINDSTRÖM, B.; KREUGER, J.; KJELLSTRÖM, E., MOYES, J. Direct and indirect effects of climate change on herbicide leaching—a regional scale assessment in Sweden. **Sci. Total Environ.**, v. 514, p. 239–249, 2015.

STRZYZEWSKA, E; SZAREK, J; BABINSKA, I. Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: a review. **Rev. Article Veteri.**, 2016.

STURM, A.; ASSIS, H. S.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Mari. Environ. Res.**, v. 47, p. 389–398, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de Peixes Teleósteos. **Villi. Com. Gráf.**, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2004.

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

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biol.**, São Paulo, v.64, n.2, p.135-142, jul./dez., 2002.

TORRE, F. R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.**, v. 131, p. 271–280, 2002.

TOUSSAINT, M. W.; SHEDD, T. R.; VAN DER SCHALIE, W. H.; LEATHER, G. R. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 907–915, 1995.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, p. 151–173, 1977.

URBINATI, E.C; GONÃÇALVES, F.D; TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus*

mesopotamicus). In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. **Editora UFSM**, Santa Maria, 2010, 606 p.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. and Pharma.**, v.13(2), p. 57–149, 2003.

VÁSQUEZ-TORRES, W.; FILHO, M.P.; ARIAS-CASTELLANOS, J.A. Studies for composition of semi purified reference diet for nutritional requirements evaluation of juvenile pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). **Rev. Bras. de Zootec.**, v. 31, p. 283-292, 2002.

VENTURA, A.S.; CORSINI, F.E.; DE ARAÚJO, GABRIEL, A. M. Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes. **Nutri.**, v. 12 (6), p. 4500–4507, 2015.

VIDYA, P.; CHITRA, K. Assessment of acute toxicity (LC50 -96 h) of aluminium oxide, silicon dioxide and titanium dioxide nanoparticles on the freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. **Int. J. Fish. Aquat. Stud.**, v. 5, p. 327–332, 2017.

WAUCHOPE, R. D.; YEH, S.; LINDERS, J. B. H. J.; KLOSKOWSKI, R.; TANAKA, K.; RUBIN, B.; UNSWORTH, J. B. Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. **Pest. Manage Sci.**, v. 58, p. 419–445, 2002.

WOYNAROVICH, E. Tambaqui e pirapitinga. Propagação artificial e criação de alevinos. Brasília. **Minist. da Irrig. e CODEVASF**, 1988. 68p.

YANCHEVA, V.; VELCHEVA, I.; STOYANOVA, S.; GEORGIEVA, E. Fish in ecotoxicological studies. **Ecol. Balk.**, v. 7, p. 149–169, 2015.

CAPÍTULO 2- Herbicida à base de 2,4-D + Picloram induz toxicidade aguda com efeitos genotóxicos, na atividade da acetilcolinesterase e nos parâmetros hematológicos do peixe Neotropical, *Piaractus brachypomus*

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da Revista *Environmental Toxicology and Pharmacology*, ISSN: 1382-6689.

Resumo

Herbicidas à base de 2,4-D e Picloram são amplamente utilizados em áreas agropecuárias e podem potencializar a contaminação de ambientes aquáticos e afetar a biota. Dessa forma, este estudo investigou a toxicidade aguda de um herbicida à base de 2,4-D + Picloram e seus efeitos subletais no peixe Neotropical *Piaractus brachypomus*. A exposição subletal aguda (96h) foi na concentração de 1,11 g L⁻¹ do produto. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi quantificada no cérebro e no músculo e amostras de sangue foram coletadas para análise dos parâmetros hematológicos e para teste de micronúcleo (MN) e anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs). A exposição aguda provocou distúrbios comportamentais como perda do reflexo e espasmos musculares. A concentração letal média (CL_{50-96h}) determinada foi de 1,54 g L⁻¹. A atividade da AChE foi inibida no músculo e os parâmetros hematológicos evidenciaram um quadro de anemia macrocítica nos animais. A exposição não promoveu aumento na frequência de MN, entretanto, houve aumento de ANEs. Em conclusão, os resultados demonstram que herbicidas formulados com 2,4-D e Picloram acarretam distúrbios fisiológicos e a inibição da AChE em peixes. As mudanças hematológicas e bioquímicas demonstraram ser eficientes biomarcadores na determinação de herbicidas em ambientes aquáticos.

Palavras-Chave: AChE; hematologia; genotoxicidade; CL50.

1. Introdução

Os herbicidas são agentes químicos aplicados em grandes volumes em áreas extensas e podem causar contaminação acidental nos reservatórios hídricos e, por essa razão, correspondem aos pesticidas mais frequentes em águas doces brasileiras (Franco et al., 2016). Entre os herbicidas amplamente utilizados, destacam-se as formulações que associam o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4-amino 3,5,6 triclora-2-piridinacarboxílico (picloram) como princípios ativos mimetizadores de auxinas (Salla et al., 2019). Entretanto, ambos apresentam alto potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas e seus efeitos negativos já foram relatados em diferentes animais, incluindo anfíbios, crustáceos e peixes (Figueiredo e Rodrigues, 2014; Menezes et al., 2014; Benli et al., 2016).

De modo geral, a intoxicação de animais por herbicidas à base de 2,4-D e picloram apresenta-se relativamente mais comum em áreas rurais (Silva et al., 2009). Em peixes, uma das ferramentas utilizadas para verificar os efeitos adversos desses produtos trata-se do teste de toxicidade aguda. A concentração letal média (CL50) de ambos compostos combinados pode variar substancialmente na faixa de 10-500 mg L⁻¹ dependendo da sensibilidade da espécie exposta (Sergeant et al., 1970). Há relatos de ações deletérias em peixes após exposições subletais prolongadas de mistura de 2,4-D e picloram, como agitação física e hiperexcitabilidade. Além disso, a exposição ocasiona efeitos fisiológicos e várias alterações morfológicas, sendo que, tais mudanças não foram observadas nos organismos expostos aos princípios ativos isoladamente (Gallagher e Digiulio, 1991).

Alterações homeostáticas nos organismos aquáticos podem ser monitoradas por meio de biomarcadores, que são ferramentas que possibilitam a mensuração das respostas adaptativas nos variados parâmetros biológicos diante dos estressores ambientais (Paulino et al., 2012). Nos estudos ecotoxicológicos, a determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) tem demonstrado sensibilidade frente a exposição a herbicidas, mesmo em concentrações ambientalmente relevantes (Cattaneo et al., 2008). A inibição da AChE resulta em um efeito neurotóxico, podendo provocar alteração na natação e equilíbrio dos organismos aquáticos (Pereira et al., 2012).

O sangue é importante na avaliação da saúde de vários organismos, incluindo os peixes, por isso, são comumente utilizados nas análises ecotóxicológicas e apresentam-se como indicador de toxicidade (Fathy et al., 2019). As investigações dos parâmetros hematológicas oferecem índices sensíveis do estado patológico dos animais e são indicadores fisiológicos essenciais, mostrando-se pertinentes na integração das resposta de peixes quando submetidos a condições de estresse (Sadauskas-Henrique et al., 2011). Em função disso, contagens leucocíticas são adequadas para avaliar as respostas diante de contaminantes, visto que se apresentam alteradas em peixes expostos a metais (Mazon et al. 2002) e pesticidas (Riaz-ul-Haq et al., 2018).

Grande parte das substâncias nocivas que alcançam os ecossistemas aquáticos apresentam efeitos citotóxicos e podem gerar danos genotóxicos nos organismos submetidos a tais condições. Nesse sentido, a análise da frequência de micronúcleos (MN) e anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs) em sangue periférico de peixes, são frequentemente utilizados como biomarcadores para avaliar a integridade cromossômica (Hussain et al., 2018). Há evidências que a exposição a contaminantes, como os herbicidas, provocam aumentos significativos na frequência de MN (Moron et al., 2006), bem como a presença de ANEs (Bonifacio e Hued, 2019) em diferentes espécies, sinalizando a indução de eventos mutagênicos.

O presente estudo determinou a toxicidade aguda de herbicida comercial à base de 2,4-D e Picloram e avaliou os efeitos subletais no peixe Neotropical *Piaractus brachypomus*. Assim, informações referentes a toxicidade do herbicida comercial e o uso de biomarcadores hematológicos, neurotóxicos e citogenotóxicos em peixe, fornecem subsídios para verificar o estado fisiológico e a sensibilidade da espécie e, dessa forma, contribuir para o monitoramento de contaminação do ambiente aquático.

2. Material e métodos

2.1. Peixe

Juvenis de *Piaractus brachypomus*, n= 82 (massa corpórea = $38,67 \pm 6,92$ g e comprimento total = $13,38 \pm 2,26$ cm) foram obtidos de uma piscicultura

situada no município de Xinguara, Pará, e transportados ao Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins, campus de Araguaína. Os peixes foram aclimatados por um período mínimo de 30 dias em tanques com capacidade de 5000 litros, com o fluxo de água constante. Foi monitorado diariamente a temperatura (26 ± 5 °C) e pH ($6,5 \pm 0,5$). Os animais foram mantidos em fotoperíodo natural e alimentação diária com ração comercial contendo 40% de proteína bruta.

2.3 Teste de toxicidade aguda

A formulação comercial do Norton® SL (Concentrado solúvel) foi utilizada como fonte dos princípios ativos associados, 2,4-D (402 g L^{-1}) e picloram ($103,5 \text{ g L}^{-1}$). O teste de toxicidade aguda foi realizado segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2016). Os peixes foram aleatoriamente divididos ($n=6$) e acondicionados em aquários com 80 litros de água contendo aeração artificial contínua para um período de aclimação de 24 horas antes do teste. Durante todo o período experimental, os peixes não foram alimentados.

Os peixes foram expostos em sete grupos, sendo um controle (concentração zero) e mais seis concentrações de Norton, sendo 1,24; 1,52; 1,66; 1,72; 1,87; $2,08 \text{ g L}^{-1}$, por um período de 96 horas. Durante o experimento, foram observados a existência de padrões de alterações comportamentais como espasmos musculares, hiperventilação dos opérculos e natação errática, segundo método de Murty (1988).

As variáveis físico-químicas da água foram avaliadas diariamente, utilizando termômetro para aferir a temperatura e kits Labcon test para o pH, O_2 , amônia, nitrito e dureza. A mortalidade foi quantificada regularmente e os animais mortos retirados dos aquários.

Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins (Processo nº 23101049/2019-65).

2.4 Exposição Subletal aguda

Após o período de aclimação e ensaios de toxicidade aguda, os peixes foram aleatoriamente divididos em dois grupos ($n=10$) e realocados em

aquários contendo 200 litros de água, dotados de aeração artificial contínua e parâmetros físico-químicos da água monitorados. Os animais tiveram a alimentação suspensa 24 horas antes da realização do experimento.

O protocolo experimental consistiu em uma exposição a concentração subletal única de $1,11 \text{ g L}^{-1}$ do herbicida em sistema estático por 96 horas. Ao final do protocolo, os animais foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e uma amostra de sangue (1 mL) foi coletada com seringas heparinizadas para análises dos parâmetros hematológicos. Após biometria, a eutanásia foi realizada por secção medular, para obtenção de amostras de cérebro e músculo. As amostras foram armazenadas a $-80 \text{ }^\circ \text{C}$ para análise dos biomarcadores neurotóxicos, fisiológicos e genotóxicos.

2.5 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi estabelecida segundo o método de quantificação do produto da reação da acetilcolina com o DTNB (5,5'-Ditio-bis-2-nitrobenzoato) (Ellman et al., 1961). Amostras dos tecidos de cérebro e músculo branco foram homogeneizados em tampão fosfato com pH 7,5 (0,1 M) e centrifugados a 10000 g por 20 minutos a 4°C . Após o tempo decorrido, foram colocados $50 \text{ }\mu\text{L}$ de sobrenadante das amostras em microplaca e acrescentados $200 \text{ }\mu\text{L}$ de DTNB e $50 \text{ }\mu\text{L}$ de Iodeto de acetilcolina (9 mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em $\lambda = 415 \text{ nm}$.

2.6 Parâmetros hematológicos

Microcapilares com sangue foram centrifugados a 12000 g por 3 minutos em centrífuga de micro hematócrito para determinação do hematócrito (Hct) segundo a metodologia de Goldenfa et al. (1971). Em seguida, foi utilizado um cartão padrão de leitura específico e os valores foram determinados em porcentagem. O número total de eritrócitos (RBC) foi estabelecido por meio de uma solução contendo $10 \text{ }\mu\text{L}$ de sangue adicionados em 2 mL de formol citrato. A contagem foi feita em câmara de Neubauer utilizando microscópio de luz Leica ICC50HD (aumento de 400x), tendo os valores expressos em $10^6 \text{ células mm}^3$. A hemoglobina total (Hb) (g dL^{-1}) foi estipulada segundo método de Collier (1994) com diluição de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de sangue diluído em 2 mL de solução de Drabkin.

A densidade foi mensurada a 540 nm em espectrofotômetro, contra um branco contendo apenas solução de Drabkin.

A partir das variáveis hematológicas, foram determinados os índices hematimétricos: o volume corpuscular médio (VCM) foi calculado como $Hct \cdot 1000 / RBC$ (μm^3); a hemoglobina corpuscular média (HCM) calculada como $Hb \cdot 1000 / RBC$ ($pg \text{ célula}^{-1}$) e a concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) como $Hb \cdot 1000 / Hct$ ($g \text{ dL}^{-1}$).

Uma alíquota de 10 μL de sangue foi usado para a confecção de extensões sanguíneas. As lâminas foram fixadas e coradas utilizando kit panótico rápido (Laborclin®). Um total de 3000 células sanguíneas foram utilizadas para a determinação de leucócitos e trombócitos totais, assim como para contagem diferencial de leucócitos (%), segundo a metodologia proposta por Sadauskas-Henrique et al. (2011).

2.7 Teste de micronúcleo (MN) e anomalias nucleares eritrocitárias (ANEs)

Lâminas de extensões sanguíneas foram fixadas em metanol e coradas com Giemsa 5%. A metodologia empregada foi a de Carrasco et al. (1990), com adaptações de Cavalcante (2008). Para definir os micronúcleos, algumas características foram avaliadas, como: ter formato semelhante ao do núcleo principal; tamanho em até 1/3 do núcleo; não apresentar refringência e apresentar mesma coloração que o núcleo principal. As principais classificações consideradas quanto a morfologia das ANEs, foram: núcleo segmentado; reniforme; lobado; entalhado; binucleado e vacuolado.

2.8 Análise Estatística

Para estimar o valor da concentração letal média (CL_{50-96h}) e o intervalo de confiança (95%), foi utilizado o método estatístico Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al., 1977).

Os dados dos biomarcadores foram expressos em média \pm E.P.M. (erro padrão da média). A homogeneidade das variações entre os grupos foi testada usando o teste de distribuição normal D'Agostino & Pearson (para $n > 8$). Para cada parâmetro, as diferenças entre o grupo controle e contaminado foi aplicado o teste-*t* de Student não pareado ou seu correspondente não paramétrico Mann-

Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma, considerado diferenças de $p < 0,05$.

3. Resultados

Nenhum animal morreu durante a exposição subletal ao herbicida. As variáveis físico-químicas da água tiveram nitrito ausente, temperatura de $25,5 \pm 0,04$ °C e dureza de $50 \pm 0,00$ CaCO₃ (ppm) no grupo controle e tratamento durante o período experimental. Dessa forma, o que refere-se as médias e erro padrão no grupo controle, conteve pH de $7,2 \pm 0,01$, OD de $6,1 \pm 0,01$ mg L⁻¹ e amônia de $0,005 \pm 0,00$ ppm, já as médias no grupo submetido a concentração evidenciou pH de $7,2 \pm 0,00$; OD de $6,1 \pm 0,01$ mg L⁻¹ e amônia de $0,002 \pm 0,01$ ppm.

3.1 Concentração letal média

Após 96h de exposição ao herbicida não foi observada mortalidade nos tratamentos controle e $1,24$ g L⁻¹ do produto. No entanto, nas concentrações de $1,52$ e $1,66$ g L⁻¹ apresentaram respectivamente 33,3% e 66,7% de mortalidade. A partir das concentrações de $1,72$ g L⁻¹ do herbicida, houve morte de 100% dos animais. A CL₅₀ do herbicida Norton para o *Piaractus brachypomus* foi $1,54$ g L⁻¹ do produto que corresponde a equivalencia de $0,59$ g L⁻¹ de 2,4-D + $0,14$ g L⁻¹ de Picloram (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração letal média (CL_{50-96h}) do herbicida Norton (2,4-D+ Picloram) para o *Piaractus brachypomus*, estimado de acordo com dados de mortalidade após 96 horas de exposição e respectivos níveis de segurança.

CL _{50-96h} (g L ⁻¹) Norton	Intervalo de confiança (g L ⁻¹)		Concentração (g L ⁻¹) 2,4 D + Picloram
	Limite inferior	Limite superior	
1,54	1,44	1,63	0,59 + 0,14

Os animais controle e os expostos a $1,24$ g L⁻¹ do herbicida, não apresentaram mudanças no comportamento. A partir das concentrações de $1,52$ g L⁻¹ foram observadas distúrbios comportamentais (Tabela 2). As manifestações

foram classificadas como leve (+) quando apresentada em até 25% dos animais, moderado (++) quando presente entre 25 e 50% dos organismos e grave (+++) quando exibidas em mais de 50% do grupo exposto (Mishra e Mohanty, 2008).

Tabela 2 Manifestações comportamentais de *Piaractus brachypomus* expostos ao herbicida Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h durante a determinação da CL_{50-96h}.

Comportamentos	Concentrações da formulação comercial do herbicida Norton(g L ⁻¹)						
	0	1,24	1,52	1,66	1,72	1,87	2,08
Natação errática	-	-	++	+++	+++	+++	+++
Hiperventilação opercular	-	-	++	+++	+++	+++	+++
Espasmos musculares	-	-	++	++	+++	+++	+++
Perda do reflexo	-	-	++	++	+++	+++	+++
Choque contra o aquário	-	-	+	++	+++	+++	+++

(-) Ausente, (+) leve, (++) moderado, (+++) grave.

3.2 Atividade da Acetilcolinesterase

Após exposição subletal, houve alteração na atividade da AChE nos animais tratados com o herbicida (Figura 1). Não houve alteração da atividade da AChE no cérebro, enquanto a atividade do músculo apresentou inibição de 19,2%.

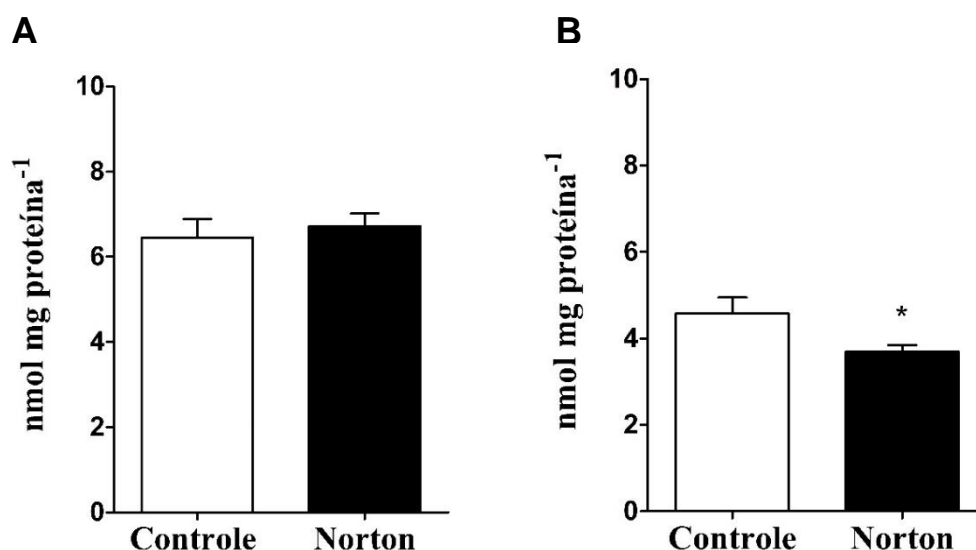


Figura 1 Atividade da acetilcolinesterase (AChE) de *Piaractus brachypomus* expostos a concentração subletal de herbicida Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) cérebro (B) e músculo. Os valores são médias (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

3.3 Parâmetros hematológicos

Os valores médios correspondentes aos parâmetros hematológicos e contagem diferencial da série branca do sangue estão descritos na Tabela 3. A exposição ao herbicida diminuiu o RBC e Hb nos organismos. Os índices hematimétricos demonstram uma não alteração do CHCM, entretanto, o VCM e o HCM aumentaram nos peixes expostos ao herbicida.

As análises de leucograma e trombograma demonstraram uma diminuição significativa dos leucócitos totais e dos trombócitos totais do grupo exposto, em relação ao grupo controle. Na contagem diferencial de leucócitos, observou-se um aumento de linfócitos e monócitos no grupo exposto quando comparados ao controle, enquanto que os neutrófilos diminuíram significativamente nos animais da concentração subletal.

Tabela 3 Parâmetros hematológicos e contagem leucocitária de *Piaractus brachipomus* expostos ao herbicida Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. Os valores são médias (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Parâmetros Hematológicos		
	Controle	Norton (2,4D+Picloram)
<i>Variáveis eritrocitárias</i>		
Hct (%)	27,2 \pm 0,4	27,0 \pm 0,8
RBC (10^4 células mm^3)	166,8 \pm 6,4	133,9 \pm 8,8*
Hb (g dL^{-1})	10,1 \pm 0,1	9,6 \pm 0,1*
<i>Índices Hematimétricos</i>		
VCM (μm^3)	165,0 \pm 5,1	196,3 \pm 8,0*
HCM (pg célula^{-1})	61,9 \pm 2,1	74,8 \pm 5,0*
CHCM (g dL^{-1})	37,4 \pm 0,6	35,8 \pm 0,9
<i>Variáveis leucocitárias</i>		
Leucócitos totais (10^3)	2,1 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1*
Trombócitos totais (10^3)	7,6 \pm 0,3	4,8 \pm 0,4*
Linfócitos (%)	45,6 \pm 1,3	57,0 \pm 1,7*
Monócitos (%)	12,7 \pm 1,8	21,8 \pm 2,0*
Neutrófilos (%)	39,9 \pm 1,6	14,7 \pm 2,0*
Eosinófilos (%)	0,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,3
CGE (%)	1,9 \pm 0,4	1,8 \pm 0,2
Basófilos (%)	0	0

CGE- Célula granulocítica

3.4 Micronúcleo e alterações nucleares eritrocitárias.

A análise da frequência de eritrócitos micronucleados de *Piaractus brachypomus* após a exposição subletal ao herbicida, não demonstrou aumento significativo (Tabela 4; Figura 2A). Em contrapartida, a análise propiciou a observação de aumento de ANEs no grupo exposto, como núcleos entalhados e nos núcleos vacuolados (Figura 2B - D).

Tabela 4 Valores médios (\pm E.P.M.) da frequência de MN e Alterações nucleares eritrocitárias em *Piaractus brachypomus* expostos a concentração do herbicida Norton (2,4-D + picloram). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Parâmetros nucleares eritrocitárias		
	Controle	Norton (2,4D+Picloram)
Micronúcleo (%)	0,01 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01
Binucleada (%)	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
Em bolha (%)	0,09 \pm 0,02	0,10 \pm 0,02
Lobulado (%)	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01
Entalhado (%)	0,33 \pm 0,03	0,51 \pm 0,03*
Vacuolado (%)	0,09 \pm 0,01	0,16 \pm 0,03*
Reniforme (%)	0,07 \pm 0,01	0,10 \pm 0,02
Segmentado (%)	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,09

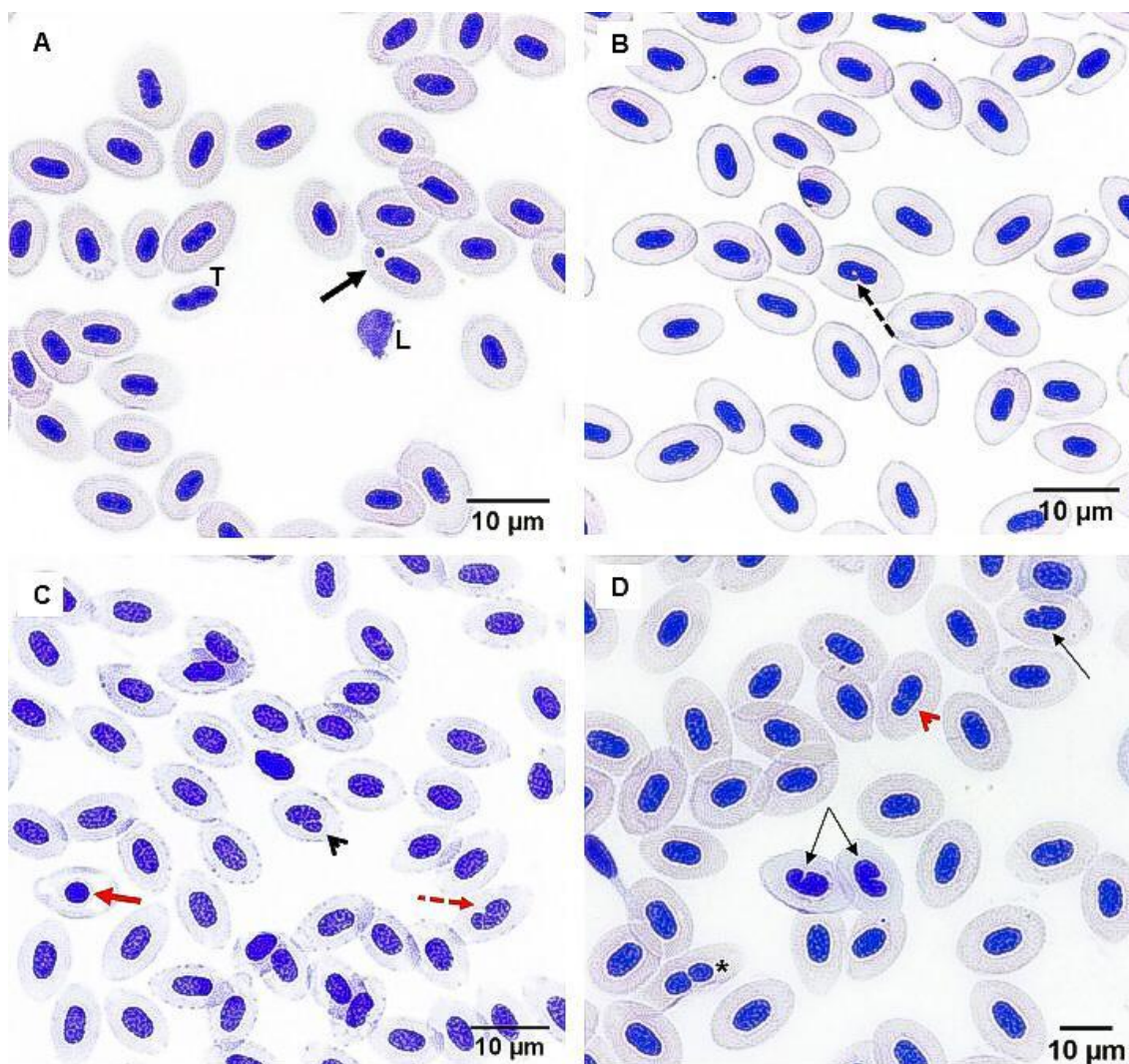


Figura 2 Micronúcleo e anormalidades nucleares encontradas em eritrócitos de *Piaractus brachypomus* expostos ao herbicida Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) Micronúcleo (seta preta contínua); (B) Núcleo vacuolado (seta preta tracejada). (C) Núcleo lobulado (cabeça de seta preta); núcleo em bolha (seta vermelha contínua); núcleo reniforme (seta vermelha tracejada). (D) núcleo entalhado (setas pretas finas); núcleo segmentado (cabeça de seta vermelha) e binucleado (asterisco). Trombócito (T); linfócito (L). Coloração: Giemsa 5%. Escala 10 µm.

4 Discussão

A formulação comercial de herbicida à base dos princípios ativos 2,4-D e picloram apresentou efeitos deletérios em *Piaractus brachypomus*, como observado em estudos aplicados em outras espécies de peixes (Gallagher e Digiulio, 1991; Botelho et al., 2009). Contudo, os estudos relacionados a toxicidade aguda dessa formulação são limitados em peixes e não há relatos da CL_{50} em *P. brachypomus*. No presente estudo, os resultados indicaram que a exposição ao herbicida ocasionou aumento na mortalidade de forma

concentração-dependente. De acordo com a classificação de toxicidade aguda para organismos aquáticos proposta por Helfrich et al. (1996), quanto menor a concentração referente a CL_{50} , mais tóxico é considerado o composto. O valor determinado da CL_{50-96h} do Norton para *P. brachypomus* foi considerado minimamente tóxico devido a CL_{50} está acima de 100 mg L^{-1} . No entanto, o herbicida foi capaz de afetar os processos fisiológicos dos organismos mesmo na concentração subletal.

Valores diferentes da CL_{50} para misturas de 2,4-D + picloram podem ser obtidos para outras espécies. De acordo com o Woodward (1982), o *Salmo clarki* apresentou-se mais sensível à mistura desses dois princípios ativos em comparação ao *P. brachypomus*, com a CL_{50-96h} estimada em $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram. Além disso, Botelho et al. (2009) evidenciou que a formulação comercial Tordon® gerou declínio na sobrevivência e sintomas e intoxicação em *Oreochromis niloticus* expostos a $1,28 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + $0,34 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram. Vale ressaltar que as diferenças de toxicidades dos pesticidas, se dão pela fórmulas utilizadas, via bioquímica influenciada e a espécie de peixe submetida (Kreutz et al., 2008).

Caso seja considerado as concentrações dos princípios ativos de modo individual, o Picloram ($0,14 \text{ g L}^{-1}$) presente na CL_{50-96h} do Norton, mostrou-se menos tóxica que a média para outras espécies, que corresponde a 36 mg L^{-1} , dependendo da espécie e estágio de vida do animal (PAN, 2020). No que se refere ao 2,4-D ($0,59 \text{ g L}^{-1}$), os resultados mostraram-se de acordo com achados para outras espécies de peixes de modo geral, pois segundo Fairchild et al. (2008), os valores de toxicidades evidenciaram ampla variação entre as espécies *Salvelinus confluentus* e *Ctenopharyngodon idella* (398 e 707 mg L^{-1}). Desse modo, não se descarta a interação entre os dois princípios ativos na formulação ou comportamento do agente químico no ambiente.

Exposições subletais de mistura de 2,4-D e picloram resultaram em alterações comportamentais em peixes, como a hiperatividade muscular (Gallagher e Digiulio, 1991). Ambos princípios ativos separados, também foram associados a essas alterações, como em *Salmo gairdneri* expostos a concentrações de picloram, que apresentaram perda de equilíbrio, problemas na natação e respiração dos organismos (Mayes et al., 1987), e em *Rhamdia quelen* expostos a concentrações subletais de 2,4-D, que manifestaram letargia e

natação irregular como consequências da alteração da atividade de AChE no cérebro e no músculo (Cattaneo et al., 2008).

A inibição da atividade da AChE desencadeia efeitos negativos no processo de neurotransmissão, como o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, que gera estimulação excessiva da membrana pós-sináptica. Em consequência disso, há prejuízos que podem levar à morte dos indivíduos, como alteração na locomoção, equilíbrio e funcionamento muscular (Pereira et al., 2012). Nesse estudo, a atividade muscular da AChE foi reduzida após o período de exposição subletal, demonstrando que o herbicida à base de 2,4-D e picloram é prejudicial a essa atividade em *P. brachypomus*. Situação semelhante foi observada por Fonseca et al. (2008), após 96h de exposição do peixe *Leporinus obtusidens* ao 2,4-D, assim como Lajmanovich et al. (2013), que também identificou a inibição da AChE em girinos (*Rhinella arenarum*) expostos a concentração de picloram individual e associado ao glifosato.

Os distúrbios comportamentais identificados em *P. brachypomus* durante o teste de toxicidade aguda, são indicadores sensíveis do efeito tóxico influenciado pela alteração da atividade da AChE. Essa enzima desempenha ação importante na neurotransmissão colinérgica central e periférica, permitindo o funcionamento adequado dos sistemas neuromuscular e sensorial do organismo (Sturm et al., 1999). No entanto, sua ação é sensível à atuação de grupos químicos de pesticidas e com isso, pode ser inibida, gerando consequências que comprometem significativamente os aspectos ecológicos que envolvem o animal, como as interações interespecíficas e o desempenho exploratório (Pereira et al., 2012).

Entre os relatos sobre os efeitos relacionados aos herbicidas formulados à base de 2,4-D + picloram na AChE, Leão et al. (2019) afirmou que moscas (*Drosophila melanogaster*) expostas a concentrações de herbicida comercial com combinação desses princípios ativos (Palace®), não apresentaram alteração na atividade cerebral da AChE após 72 horas. Dessa forma, é sugerido nesse trabalho, que a inibição apresentada na atividade muscular dessa enzima, exerceu influência negativa no comportamento e equilíbrio dos peixes submetidos a exposição.

Os parâmetros hematológicos de peixes podem sofrer alterações quando submetidos a estressores. Dessa forma, avaliar esses parâmetros, permite

reconhecer os efeitos adversos que os herbicidas geram na saúde desses organismos (Saravanan et al., 2017). Nesse contexto, nossos resultados demonstraram diminuição significativa de RBC e de Hb em *P. brachypomus* após exposição, sugerindo que o composto induziu condições anêmicas nos animais. No entanto, a concentração não afetou o CHCM, mas apresentou aumento significativo no VCM e no HCM, indicando que o quadro de anemia demonstrado trata-se da classificação macrocítica, que corresponde a um aumento no volume das hemácias, em razão a toxicidade do herbicida. Nessas condições, há uma assincronia da maturação nuclear em relação ao crescimento citoplasmático e, por isso, os eritrócitos tornam-se maiores devido o preparo para uma divisão celular que não acontece devidamente (Hoffman et al., 2009).

De acordo com Witeska (2015), o inchaço dos eritrócitos geralmente é uma reação compensatória ao decréscimo da concentração de oxigênio no sangue, e esse ajuste pode auxiliar no aumento da ligação hemoglobina-oxigênio e, assim, melhorar o transporte de oxigênio para os tecidos do animal. Outro mecanismo de ajuste para manter o consumo de oxigênio, trata-se da hiperventilação opercular, que aumenta o movimento de água através das brânquias e ajuda a manter o diferencial de pressão necessário para a difusão de oxigênio no sangue durante a troca contra-corrente (Schmidt-Nielsen, 1997), como foi observado em *P. brachypomus* durante o teste de toxicidade aguda nesse estudo.

Outros herbicidas mimetizadores de auxina foram capazes de induzir alterações hematológicas que resultaram em condições anêmicas, como observado em *O. niloticus* expostos a concentração subletal de Quinclorac (Fathy et al., 2019) e *Cyprinus carpio* submetidos a concentrações de MCPA, que tiveram as alterações hematológicas acompanhadas por lesões estruturais em órgãos hematopoiéticos (Lutnicka et al., 2018). Entre os principais fatores que causam anemia em peixes expostos a herbicidas, estão incluídos o acréscimo na destruição dos eritrócitos, disfunção osmorregulatória e a insuficiência na atividade hematopoiética do rim e do baço, que geralmente está associada a patologias nesses tecidos (Mikula et al., 2008).

Os glóbulos grancos são células reguladoras do sistema imunológico e representam a defesa do organismo contra corpos estranhos e doenças infecciosas. Em peixes, as respostas imunológicas dependem das

características e intensidade dos agentes estressores (Saravanan et al., 2017). Após a exposição a concentração de Norton nesse estudo, houve indícios de uma diminuição da resposta imune não específica de *P. brachypomus*, evidenciado pela diminuição dos leucócitos e trombócitos totais. A leucopenia apresentada, pode ser atribuída a redução dos neutrófilos, que foi acompanhada pelo acréscimo da porcentagem de monócitos e linfócitos.

Em teleósteos, os monócitos são células fagocitárias que constituem uma pequena fração dos leucócitos totais. O aumento no número dessas células no sangue é normalmente desencadeado por respostas inflamatórias, geralmente atribuída a lesões teciduais (Sadauskas-Henrique et al., 2011). Da mesma forma, a diminuição dos neutrófilos circulantes pode sugerir aumento do recrutamento desse grupo celular para tecidos que apresentam lesão focal (Havixbeck e Barreda, 2015). As mudanças apresentadas nesse estudo, podem sugerir anormalidades de produção, liberação, vida média e também ingresso tecidual.

Em *P. brachypomus*, o herbicida Norton (2,4-D+picloram) gerou alterações morfológicas nas brânquias, fígado e rim após 96 horas de exposição subletal aguda (dados não publicados), indicando que o produto é capaz de gerar danos teciduais. Segundo Gómez et al. (1998), as alterações no sangue periférico de peixes *Tinca tinca* foram atribuídas a distúrbios da hematopoiese pelo rim, decorrentes de lesões neste tecido após exposição ao 2,4-D. De maneira geral, uma diminuição significativa na série branca do sangue opode tornar os peixes suscetíveis a doenças, infecções parasitárias e até a morte (Wiik et al., 1989).

Diversos estudos sugerem que ambos os princípios ativos presentes no Norton podem gerar efeitos genotóxicos em níveis cromossômicos e de DNA dependendo da espécie estudada, como a indução de MN e ANEs em peixe neotropical *Cnesterodon decemmaculatus* após 48 e 96 horas de exposição ao herbicida 2,4-D (Arcaute et al., 2016) e a indução de MN em girinos (*Rhinella arenarum*) após 48 h de exposição ao picloram de forma individual e associada ao glifosato (Lajmanovich et al., 2013). Nesse estudo, os resultados evidenciaram que o herbicida não gerou efeitos clastogênicos. No entanto, a baixa indução de MN em *P. brachypomus* durante o período experimental observado (96h), pode estar relacionado ao atraso na síntese de DNA durante a

eritropoiese que, conseqüentemente, levou a anemia macrocítica nos animais.

Segundo Udrouiu (2006), o surgimento de micronúcleos em eritrócitos depende da ação do composto e do ciclo mitótico dessas células, que varia de acordo com a espécie. Vários agentes químicos, resultam na interrupção da eritropoiese, logo, a produção de eritrócitos micronucleados também é inibida, induzindo a um falso negativo mesmo sendo compostos potencialmente genotóxicos. Dessa forma, González et al. (2005) relatou que o 2,4-D em formulação comercial e em sal de dimetilamina, reduziram o índice mitótico mas também provocaram danos no DNA de culturas colhidas às 24 e 36 h em células de ovário de ratos.

A concentração testada do herbicida comercial Norton, alterou a forma nuclear dos eritrócitos de *P. brachypomus*, que foi registrado pelo aumento na frequência de núcleos entalhados e vacuolados. As ANEs podem ser explicadas pela tentativa de controle do ciclo celular e de reparo do DNA em uma região cromossômica afetada e, com isso, a membrana nuclear apresenta imperfeições, caracterizando essas anormalidades (Shimizu et al., 1998). Outro mecanismo que justifica tais alterações, refere-se ao estresse oxidativo, que ocasiona perda da integridade e mudança na permeabilidade da membrana nuclear, sendo esse, um efeito dos pesticidas (Ansari et al., 2009). Com isso, Oakes e Pollak (1999) relataram que a formulação comercial à base de 2,4-D e picloram (Tordon 75D®) provocou danos à membrana e às enzimas mitocondriais de fígado de ratos, aumentando a sua permeabilidade e gerando efeitos adversos graves nas funções oxidativas.

5 Conclusão

Os resultados demonstraram que a concentração letal média do herbicida comercial Norton em *P. brachypomus* foi classificada como minimamente tóxica, entretanto, apresenta efeitos nocivos como alterações comportamentais e fisiológicas mesmo em concentração subletal. A inibição da AChE no músculo após a exposição pode estar associada a efeitos neurotóxicos, afetando o sistema neuromuscular, comprometendo funções importantes como locomoção e desempenho exploratório observado. O quadro de anemia macrocítica apontado pelas mudanças nos parâmetros hematológicos, representa uma

provável resposta compensatória para manter o transporte de oxigênio em níveis adequados. No entanto, essas condições poderiam estar relacionadas ao atraso na síntese de DNA e conseqüentemente da eritropoiese, sugerindo que esse mecanismo possa ter influenciado na baixa frequência de MN no período de 96 horas. Por outro lado, as alterações nucleares observadas indicaram o herbicida comercial à base de 2,4-D e picloram gerou efeito citogenotóxicos nos animais. Considerando os efeitos causado pelo herbicida, os peixes demonstraram sinais de estresse e alterações fisiológicas que podem comprometer a sobrevivência dos organismos mesmo que em concentração subletal.

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe do Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins e do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, SP. A autora Kamilla Pereira da Silva agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa recebida.

Referências

- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 15088:2016. Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda: método de ensaio com peixes. <https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=364988>. (Acesso em 20 de maio de 2020).
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C. D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicol.* , 343, 121–135.
- Ansari, R. A., Kaur, M., Ahmad, F., Rahman, S., Rashid, H., Islam, F., Raisuddin, S., 2009. Genotoxic and oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of a freshwater biomarker fish species, *Channa punctata* Bloch. *Environmental Toxicology*. 24(5), 429–436.
- Arcaute, C.R., Soloneski, S., Larramendy, M. L., 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*, *Ecotox. Environ. Safe.* 128, 222-229.
- Benli, A.C., K., Sarikaya, R., Sepici-Dincel, A., Selvi, M., Sahin, D., Erkoç, F., 2007. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 296–299.

Bonifacio, A. F., Hued, A. C., 2019. Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*, 236, 124311.

Botelho, R.G., Santos, JB., Oliveira, TA., Braga, RR., Byrro, ECM., 2009. Toxicidade aguda de herbicidas à Tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Planta Daninha*, v. 27, p. 621-626.

Carrasco, K.R., Tilbury, K.L., Myers, M.S., 1990. Assessment of the micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 47, 2123-2136.

Cattaneo, R., Loro, V. L., Spanevello, R., Silveira, F. A., Luz, L., Miron, D. S., Clasen, B., 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pesticide Biochem. and Physiol.* 92(3), 133–137.

Cavalcanti, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sopia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*. 655, 41–46.

Collier, H.B., 1944. The standardization of blood hemoglobin determinations. *Can. Med. Assoc. J.* 50, 550-552.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, J.R.V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.

Fairchild, J. F., Allert, A., Sappington, L. S., Nelson, K. J., Valle, J., 2008. Using accelerated life testing procedures to compare the relative sensitivity of rainbow trout and the federally listed threatened bull trout to three commonly used rangeland herbicides (picloram, 2,4-d, and clopyralid). *Environmental Toxicol. and Chemistry.* 27(3), 623.

Fathy, M., Mohamed, I. A., Farghal, A. I. A., Temerak, S. A. H., Sayed, A. E.D. H., 2019. Hemotoxic effects of some herbicides on juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Environ. Sci. and Pollution Research*, v. 26, p. 30857-30865.

Figueiredo, J., Rodrigues. D.J., 2014. Effects of four types of pesticides on survival, time and size to metamorphosis of two species of tadpoles (*Rhinella marina* and *Physalaemus centralis*) from the southern Amazon, Brazil. *Herpetological Journal.* 24, 7–15.

Fonseca, M.B., Gluszczak, L., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Goncalves, F.F., Loro, V.L., 2008. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotox Environ Safe.* 69, 416–420.

Franco, M. H. R., Lemos, V. T., França, A. C., Schiavon, N. C., Albuquerque, M. T., Alecrim, A.O. D'antonino, L., 2016. Physiological and morphological characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soil with picloram residues. *Pesq. Agropecuária Tropical*. 46, 276-283.

Gallagher, E., Digiulio, R., 1991. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicology Letters*. 57(1), 65–72.

Gholami-Seyedkolaei, S. J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., and Kosari, A. A., 2013. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 135–141.

Goldenfa, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clin. Pathol.* 56, 35-39.

Gomez, L., Masot, J., Martinez, S., Duran, E., Soler, F., Roncro, V., 1998. Acute 2,4-D poisoning in tench (*Tinca tinca* L.): lesions in the hematopoietic portion of the kidney. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 479–483.

González, M., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2005. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol In Vitro*;19:289–97

Hamilton, M. A., Russo, R. C., Thurston, V., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Techenology*. 7, 714 - 719.

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

Helfrich, L.A., Weigmann, D.L., Hipkins, P., Stinson, E.R., 1996. Pesticides and aquatic Animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. *Va Coop Ext* 420-013.

Hoffman, R., Benz, E.J., Furie, B., Shattil, S.J., Silberstein, L.E., McGlave, P., Heslop, H., 2009. Hematology: basic principles and practice. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone.

Hussain, B., Sultana, T., Sultana, S., Masoud, M.S., Ahmed, Z., Mahboob, S., 2018. Fish eco-genotoxicology: comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 393-398.

Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martings, D., Lorenson, M., Marteninghe, A., Silva, L.B., 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciência Rural*. 38,

1050–1055.

Lajmanovich, R.C., Junges, C.M., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Basso, A., 2014. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water Air Soil Pollut.* 224.

Leão MB, Gonçalves DF, Miranda GM, da Paixão GMX, Dalla Corte CL (2019) Toxicological evaluation of the herbicide Palace® in *Drosophila melanogaster*. *J Toxicol Environ Health A.*, 82, 1172– 1185.

Lutnicka, H., Bojarski, B., Witeska, M., Chmurska-Gąsowska, M., Trybus, W., Trybus, E., Kopacz-Bednarska, A., Lis, M., 2018. Effects of MCPA herbicide on hematological parameters and ultrastructure of hematopoietic tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Folia Biol. (Kraków)* 66 (1).

Mayes, M.A., Hopkins, D.L., Dill, D.C., 1987. Toxicity of picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) to life stages of the rainbow trout. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 653-660.

Mazon, A. F., Monteiro, E. A. S., Pinheiro, G. H. D., Fernandes, M. N., 2002. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Braz J Biol.* 62(4A), 621–631.

Menezes, C., Fonseca, M.B., Leitemperger, J., Pretto, A., Moraes, B.S., Murussi, C.R., Baldisserotto, B., Loro, V.L., 2014. Commercial formulation containing 2, 4-D affects biochemical parameters and morphological indices of *Silver catfish* exposed for 90 days. *Fish Physiol Biochem.* 41, 323–330.

Mikula, P., Modra, H., Nemethova, D., Groch, L., Svobodova, Z., 2008. Effects of subchronic exposure to LASSO MTX (alachlor 42% W/V) on hematological indices and histology of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 475–479.

Mishra, A. K., Mohanty, B., 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environ. Toxicol. and Pharma.* 26(2), 136–141.

Moron, S.E., Polez, V.L.P., Artoni, R.F., Ribas, J.L., Takahashi, C.H.K., 2006. Estudo de Alterações na Concentração dos Íons Plasmáticos e da Indução de Micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* Exposto ao Herbicida Atrazina. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 1, 27–30.

Murty, A.S., 1988. *Toxicology of pesticide to fish*. Boca Raton: CRC Press, 129 p. Naveed A, Venkateshwarlu P., Janaiah C., 2010. Impact of Sublethal Concentration of Triazophos on Regulation of Protein Metabolism in the fish *Channa punctatus* (Bloch). *African Journal of Biotechnology.* 9(45), 7753-7758.

Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., Wahl, G.M., 1998. Selective entrapment of

extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase, *J. Cell Biol.* 140, 1307–1320.

Oakes, D.; Pollak, J., 1999. Effects of a herbicide formulation, Tordon 75D®, and its individual components on the oxidative functions of mitochondria. *Toxicology*, 136, 41–52, 1999.

PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America. San Francisco, CA. <http://www.pesticideinfo.org>. (Acesso em 17 de junho de 2020).

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

Pereira, V.M., Bortolotto, J.W., Kist, L.W., de Azevedo, M.B., Fritsch, R.S., Oliveira, R.L., Pereira, T.C.B., Bonan, C.D., Vianna, M.R., Bogo, M.R., 2012. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*. 33, 469–47.

Riaz-ul-Haq, M., Javeed, R., Iram, S., Rasheed, M.A., Amjad, M., Iqbal, F., 2018. Effect of Diafenthiuron exposure under short and long term experimental conditions on hematology, serum biochemical profile and elemental composition of a nontarget organism, *Labeo rohita*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 62, 40-45.

Sadauskas-Henrique, H., Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Fernandes, M.N., 2011. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. *Environ. Monitor and Assess.* 181, 29-42.

Salla, B. F., Bracht, L., Valderrama Parizotto, A., Comar, J. F., Peralta, R. M., Bracht, F., Bracht, A., 2019. Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2,4-D and picloram in the liver. *Toxicol. Letters.* 313, 137-149.

Saravanan, M., Kim, J.Y., Hur, K.J., Ramesh, M., Hur, J.R., 2017. Responses of the freshwater fish *Cyprinus carpio* to different concentrations of butachlor and oxadiazon. *Biocatal Agric Biotech.* 11, 275–281.

Schmidt-Nielson, K., 19987. *Animal Physiology: Adaptation and Environment* 5th edn Cambridge Univ. Press.

Sergeant, M., Blazek, D., Elder, J. H., Lembi, C. A., Morre, D. J., 1970. The toxicity of 2,4-D and picloram herbicides to fish, *Proc. Indiana Acad. Sci.* 80, 114.

Silva, M. A. da, de Paoli, T. M. P., Souza, T. D. de, Fonseca, L. A. da, Domingues, P. S. A., & Barioni, G., 2009. Sinais Nervosos e morte associados a acaricida contaminado por Tordon® (2,4 - D, 64/240 Trietanolamina) Em Bezerros, no Município de Guarapari, no Espírito Santo, Brasil. *Ciên. Animal Brasileira*, 1, 319- 324.

Sturm, A.; Assis, H. S.; Hansen, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environ. Research*, v. 47, p. 389–398, 1999.

Udroiu, I. (2006). The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 201–204.

Wiik, R., Andersen, K., Uglenes, I., Egidius, E., 1989. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern. *Aquaculture*. 83, 201–215.

Witeska, M., 2015. Anemia in teleost fishes. *Bull Eur Ass Fish Pathol*. 35(4), 148–160

Woodward, D.F., 1982. Acute toxicity of mixtures of range management herbicides to Cutthroat trout, *J. Range Manag.* 35, 539–540.

CAPÍTULO 3- Alterações morfofuncionais em fígado, brânquias e rim induzidas por herbicida à base de 2,4-D + Picloram em peixe Neotropical, *Piaractus brachypomus*

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da Revista *Chemosphere*, ISSN: 0045-6535.

Highlights

- A formulação de herbicida à base de 2,4-D + Picloram demonstrou ser potencialmente tóxica para *P. brachypomus*.
- Houve depleção de estoque de glicogênio no músculo e o aumento de glicose plasmática.
- As análises histopatológicas indicaram comprometimento do tecido hepático e branquial.
- O herbicida não afetou a capacidade de desintoxicação da via enzimática de biotransformação GST-GSH.

Resumo

Entre os defensivos agrícolas extensamente utilizados, destacam-se os herbicidas à base de 2,4-D + picloram, indicados para o controle de plantas daninhas. Esses compostos apresentam alto potencial de contaminação de ambientes aquáticos, podendo gerar efeitos negativos para organismos não alvos. Este estudo avaliou a morfologia e função do tecido hepático, branquial e renal via biomarcadores em *Piaractus brachypomus*, expostos ao herbicida à base de 2,4-D + Picloram. Peixes juvenis foram expostos em sistema estático, por 96 h, a uma concentração subletal do herbicida comercial Norton® (1,11 g L⁻¹), como fonte dos princípios ativos 2,4-D e Picloram. Amostras de plasma, músculo e fígado foram submetidas à análise das atividades enzimáticas e quantificação dos intermediários metabólicos, como glicose, glicogênio, proteína e amônia. Amostras de brânquias, fígado e rim foram destinadas às análises histopatológicas e sistema enzimático de desintoxicação (glutathione S-transferases-GST e glutathione reduzida-GSH), bem como à medição do conteúdo de peroxidação lipídica (LPO). A exposição aguda induziu um aumento da glicose plasmática e diminuição de glicogênio muscular. Os biomarcadores de hepatotoxicidade não evidenciaram danos graves no fígado. A via enzimática de biotransformação GST-GSH e a LPO evidenciaram que o composto não afetou a capacidade de desintoxicação do sistema de defesa antioxidante. As alterações histopatológicas observadas nas brânquias, fígado e rim evidenciaram comprometimento morfofuncional, sendo alterações decorrentes da ação direta e indireta do agente tóxico. O composto não excedeu a capacidade de detoxificação do sistema de defesa antioxidante, o que diminuiu os efeitos de danos oxidativo. Em conclusão, os resultados demonstram que o herbicida comercial gerou mudanças morfofisiológicas e metabólicas em *P. brachypomus*, demonstrando a eficácia da integração de biomarcadores para a verificação dos efeitos de herbicidas em peixes.

Palavras-Chave: Glicogenólise; atrofia dos hepatócitos; constrição das células pilares; proteinúria.

1. Introdução

O controle químico de ervas daninhas presentes na produção agrícola é realizado principalmente por aplicação de herbicidas, o que coloca o Brasil como um dos principais usuários desse mercado (Rigotto et al., 2014). As formulações comerciais de herbicidas que associam o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido 4-amino 3,5,6 triclora-2-piridinacarboxílico (picloram) são amplamente recomendadas para aplicações pós-emergentes, por apresentarem alta eficiência química e não permitir o rebrote das espécies indesejadas (Caldeira et al., 2014). Devido ao uso generalizado desses compostos, ambos são frequentemente detectados em reservatórios que fornecem água potável e oferecem alto potencial de contaminação de ambientes aquáticos (Donald et al., 2007). De maneira geral, as ações deletérias de misturas de 2,4-D e picloram relatadas em organismos, incluem efeitos teratogênicos, neurotóxicos, citotóxicos e hepatotóxicos (Blakley et al., 1989; Gallagher e Digiulio, 1991; Oakes e Pollak, 1999; Leão et al., 2019).

O fígado é o órgão mais associado à desintoxicação e processo de biotransformação, além de desempenhar outras funções importantes como o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios (Tavares et al., 2018). Em ratos, a associação de 2,4-D e picloram foi capaz de gerar inibição do metabolismo energético do fígado, evidenciado pelas modificações nos intermediários metabólicos (Salla et al., 2019). Em peixes, assim como em outros vertebrados, a exposição à mistura desses compostos pode induzir variações morfofisiológicas no tecido hepático (Gallagher e Digiulio, 1991). Por essa razão, biomarcadores plasmáticos contribuem para a avaliação dos efeitos dos poluentes no tecido hepático, como a atividade das fosfatases ácidas (FAC) e alcalinas (FAL) que indicam a integridade das membranas que são responsáveis por transportes de fosforilados intermediários (Bernet et al., 2001), e as aminotransferases (alaninaaminotransferase – ALT; aspartato-aminotransferase – AST) que estão associadas a lesões hepáticas que geram rompimento celular (Ozer et al., 2008).

Outros órgãos são considerados alvos frente às mudanças ambientais, como as brânquias, que funcionam como uma barreira entre o ambiente externo e interno (Moron et al., 2003). Lesões patológicas nesse tecido podem prejudicar

funções fisiológicas essenciais para os peixes, como trocas gasosas, osmorregulação e excreção, gerando consequências graves aos indivíduos (Sakuragui et al., 2003). Devido a isso, há relatos que a combinação de 2,4-D e picloram foi capaz de gerar danos morfológicos nas brânquias e ocasionou a diminuição da capacidade de regulação de íons em bagres (*Ictalurus punctatus*) (Gallagher e Digiulio, 1991). Em teleósteos, o rim também constitui um dos primeiros órgãos afetados por poluentes, em razão do grande fluxo sanguíneo e por atuar nas atividades excretórias e hematopoiéticas (Evans, 1993). Devido à isso, a ação de herbicidas são frequentemente associadas às disfunções nesse tecido (Husak et al., 2014; Badroo et al., 2020).

Grande parte dos xenobióticos podem desencadear estresse oxidativo, causado pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas durante transformação metabólica em organismos. Os sistemas de defesa antioxidante consistem em uma variedade de enzimas e antioxidantes não enzimáticos, como o sistema GST-GSH que atua na fase II da desintoxicação, conjugando os metabólitos produzidos pela fase I da biotransformação. Em condições normais, após a conjugação dos compostos tóxicos, o produto gerado é excretado da célula, evitando dano celular potencial (Van der Oost et al. 2003). No entanto, quando há produção de ERO em níveis que excedessem a capacidade de neutralização do sistema de defesa antioxidante, há o dano oxidativo, provocando danos celulares, como a peroxidação lipídica (LPO) (Sakuragui et al., 2019).

De modo geral, os ajustes bioquímicos, fisiológicos e o estresse oxidativo, podem resultar em alterações que comprometem os funcionamentos de órgãos em peixes (Husak et al., 2014; Paulino et al., 2020). Nesse contexto, este estudo investigou comprometimento morfofuncional do tecido hepático, branquial e renal em *Piaractus brachypomus* expostos à herbicida comercial à base de 2,4-D + Picloram, utilizando a integração de biomarcadores plasmáticos, histopatológicos e de biotransformação.

2. Materiais e Métodos

2.1. Peixe

Vinte juvenis de *Piaractus brachypomus*, (massa corpórea = $38,67 \pm 6,92$ g e comprimento total = $13,38 \pm 2,26$ cm) foram adquiridos de uma piscicultura situada no município de Xinguara (Pará, Brasil) e transportados ao Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins. Os animais foram aclimatados por um período mínimo de 30 dias em tanques com capacidade de 5000 litros, com o fluxo constante de água. Durante esse período, foram alimentados diariamente com ração comercial contendo 40% de proteína bruta e foram mantidos em fotoperíodo natural.

A análise das variáveis físico-químicas da água do período de aclimação e posterior delineamento foi monitorada diariamente: ausência de nitrito; temperatura $25,5 \pm 0,04$ °C; dureza de $50 \pm 0,00$ CaCO₃ (ppm); pH $7,2 \pm 0,01$; OD de $6,1 \pm 0,01$ mg L⁻¹ e amônia de $0,005 \pm 0,00$ ppm.

2.4 Delineamento experimental

Após o período de aclimação, os peixes foram aleatoriamente divididos em dois grupos (n=10) e realocados em aquários contendo 200 litros com os parâmetros físico-químicos monitorados e aeração artificial contínua. A formulação comercial do Norton® SL (Concentrado solúvel) foi utilizada como fonte dos princípios ativos associados: 2,4-D (402 g L⁻¹) e picloram ($103,5$ g L⁻¹). Para a exposição em 96 horas, foi usado uma concentração subletal única de $1,11$ g L⁻¹ do herbicida.

Imediatamente após o período de exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1$ g L⁻¹) e uma amostra de sangue (1 mL) foi coletada da veia caudal com seringas heparinizadas para obtenção de plasma. Após biometria, a eutanásia foi realizada por secção medular e amostras de fígado, brânquias, rim e músculo foram coletadas e divididas em alíquotas. As amostras de plasma e dos tecidos foram armazenadas a -80 °C para análise bioquímicas e as alíquotas restantes de brânquias, fígado e rim foram fixadas

em Glutaraldeído a 2,5% em tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,3) para análises morfológicas. Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins (Processo nº 23101049/2019-65).

2.3 Análises bioquímicas

As amostras de fígado, brânquias, rim e músculo foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 7,8 ou tampão tris-HCL 100 mM, EDTA 2Mm e MgCl₂ 5 mM, pH 7,7 e centrifugadas a 10000 g, 4°C por 10 minutos, para obtenção do sobrenadante, os quais foram utilizados como fonte de enzimas para hepatotoxicidade, biomarcadores de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e metabólitos.

A determinação das atividades da alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST) no plasma (U mL⁻¹), foram aplicadas por meio do kit comercial Labtest® (ref. 1008 e 109, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. O método constitui-se com base na extinção do NADH e a absorbância em 340 nm é diretamente proporcional à atividade da ALT e AST na amostra. Para a determinação da atividade da fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase ácida (FAC) plasmáticas (mmol min mL⁻¹) foi utilizado kit comercial da Labtest® (ref. 79 e ref. 39, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. A FAL foi determinada com base na quantidade produzida de p-nitrofenol a partir da hidrólise de p-nitrofenilfosfato, medida em 405 nm e a ação enzimática da FAC foi determinada por meio do substrato de timolftaleína monofosfato.

Os extratos metabólitos foram preparados após homogeneização do tecido ou desproteinização do plasma com ácido tricloroacético a 20%. Com base na metodologia de Gentskow e Masen (1942), a amônia (U mL⁻¹ plasma) foi quantificada fotometricamente em extratos ácidos. A glicose plasmática (mg dL⁻¹) foi determinada fotometricamente em extratos neutros, por meio de um kit comercial Labtest® (ref. 133) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do glicogênio hepático e muscular (µmol de glicosil-glicose g tecido⁻¹) foi estabelecida pela concentração de açúcares redutores total na amostra, de acordo com Bidinotto et al. (1997) e o teor da proteína total (mg g tecido⁻¹ ou mg mL plasma⁻¹) foi determinado utilizando o reagente de Bradford e

albumina bovina (1 mg mL^{-1}) como solução padrão, conforme descrito por Kruger (1994).

Para análises do sistema de biotransformação GSH-GST, a atividade da GST ($\text{U mg proteína}^{-1}$) foi baseada no método descrito por Habig e Jakobi (1981), submetendo o 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A absorbância foi monitorada a 340 nm, durante 3 minutos com intervalos de 30 segundos. A concentração de GSH ($\text{nmol GSH mg proteína}^{-1}$) foi definida utilizando a metodologia descrita por White et al. (2003), a qual foi medida pela conjugação de 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA) 10 mM ao GSH do sobrenadante da amostra, formando um composto fluorescente. As leituras foram feitas em 472 nm de excitação e 528 nm de emissão contra uma curva padrão de GSH (40 nM).

O dano oxidativo de lipídios foi avaliado medindo o conteúdo de LPO ($\text{nmol mg proteína}^{-1}$), sendo estabelecida pelo método FOX (oxidação do ferro pelo xilenol laranja) conforme descrito por Jiang et al. (1992). Foi utilizado 30 μL de amostra + 270 μL de meio de reação (Metanol-grau HPLC 90%, 100 μM Xilenol Laranja, 25 mM H_2SO_4 , 4 mM BHT-hidroxitolueno butilado, 250 μM FeSO_4NH_4 -sulfato ferroso amoniacal). Após isso, as microplacas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 min em local escuro e lidas em 560 nm. Posteriormente, foram comparadas a um padrão com solução de Cumeno Hidroperóxido- CHP (1mM).

2.4 Análises morfológicas

Após as amostras de brânquias, fígado e rim serem fixadas em glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3), foram desidratadas em etanol em série crescente e, posteriormente, incluídas em historesina (Leica). As seções foram cortadas em espessura de 3 μm e coradas com azul de toluidina e fucsina básica. Nas análises histopatológicas foram adotadas um método randomizado às cegas utilizando microscópio de luz Leica ICC50HD sob magnificação de 400 vezes. As análises dos tecidos foram realizadas em 25 campos aleatórios, em 05 secções diferentes por animal.

As análises histopatológicas foram determinadas de acordo com Bernet et al. (1999), modificada por Paulino et al. (2020). Com base no modo que cada

patologia altera a função do órgão analisado, foi atribuído um Fator de importância (Fi) para cada lesão. Esse Fi é classificado em: 1= lesões facilmente reversíveis e com pouca importância patológica; 2= lesões reversíveis quando o agente estressor é neutralizado de, então, moderada importância patológica; 3= lesões geralmente irreversíveis e de extrema importância patológica. Além disso, para classificar a frequência de cada patologia durante as análises, foram atribuídos valores numéricos (*score*), sendo 0= ausência de lesão, 1= ocorrência rara, 2= ocorrência leve, 3= ocorrência moderada e 4= ocorrência grave.

Dessa forma, foi possível verificar o índice de alteração individual do órgão (I_{alt}), que é estipulado para cada lesão de cada indivíduo, determinado pela multiplicação do Fi pelo valor do *score* (Sc) ($I_{alt} = Fi \times Sc$). Com os valores resultantes dos I_{alt} , foi realizado uma somatória (ΣI_{alt}) para cada organismo, para assim, estabelecer um valor final que expressa o comprometimento morfofisiológico do tecido do animal. Esse valor final é denominado I_{org} ou Índice histopatológico do órgão ($I_{org} = \Sigma I_{alt}$).

2.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos em média \pm E.P.M. (erro padrão da média). Foram aplicados o teste de distribuição normal D'Agostino & Pearson (para $n > 8$) para testar a homogeneidade das variações entre os grupos. Para cada parâmetro, as diferenças entre o grupo controle e contaminado foi verificado por meio do teste-*t* de Student não pareado ou seu correspondente não paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prisma 5.0, considerando diferenças de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Atividades enzimáticas das fosfatases e transaminases

Nenhum peixe morreu durante as 96 horas de exposição. A Figura 1 mostra a atividade das fosfatases e transaminases no plasma de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida de formulação comercial. As atividades

referentes à ALT, AST e FAC não foram alteradas, entretanto, a atividade da FAL diminuiu 56% em relação ao grupo controle.

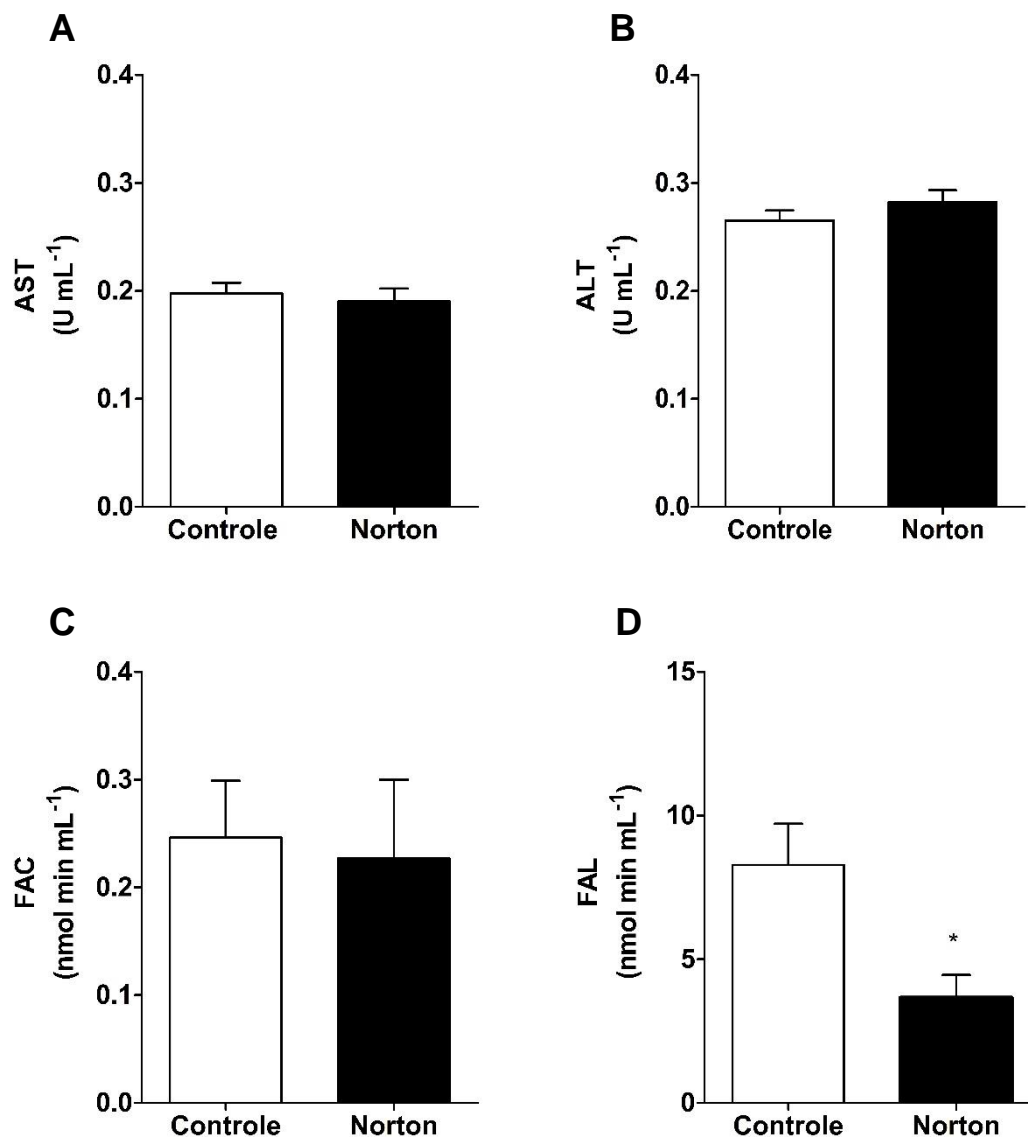


Figura 1 Atividades da aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), fosfatase ácida (FAC) e fosfatase alcalina (FAL) no plasma de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. Os valores são médios (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

3.2 Metabólicos

As concentrações de metabólitos no plasma, fígado e músculo estão representados na Tabela 1. Após 96 h de exposição ao herbicida, alterações metabólicas significativas foram observadas em *P. brachypomus*. Os níveis de glicose plasmática aumentaram 16,9% no grupo exposto, enquanto que o glicogênio muscular diminuiu 67,84%. O glicogênio hepático não evidenciou alteração. A proteína plasmática diminuiu 20,4% nos animais expostos.

Tabela 1 Concentrações de metabólitos no plasma, fígado, músculo de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. Os valores são médias (\pm E.P.M.). (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Metabólicos intermediários			
Variáveis	Tecido	Controle	Norton (2,4D+Picloram)
Amônia (mL^{-1} plasma)	Plasma	0,455 \pm 0,096	0,447 \pm 0,068
Glicose (mg dL^{-1})	Plasma	147,9 \pm 4,163	172,9 \pm 7,567*
Glicogênio (μmol de glicosil-glicose g tecido $^{-1}$)	Fígado	16,91 \pm 8,094	29,47 \pm 7,843
	Músculo	175,9 \pm 51,09	56,58 \pm 18,75*
Proteína (mg g tecido^{-1} ou mg mL plasma^{-1})	Plasma	18,20 \pm 1,180	14,50 \pm 0,924*
	Fígado	5,033 \pm 0,326	4,711 \pm 0,289
	Músculo	2,006 \pm 0,137	2,043 \pm 0,082

3.3 Sistema de biotransformação GSH-GST e peroxidação lipídica

A atividade da GSH e da GST, bem como os níveis de LPO não evidenciaram alterações após o período de 96 horas de exposição ao herbicida (Tabela 2).

Tabela 2 Atividades da enzima antioxidante GST e níveis de glutatona (GSH) e peroxidação lipídica no fígado, brânquias e rim de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h.

Sistema de biotransformação GSH-GST e dano oxidativo de lipídios			
Variáveis	Tecido	Controle	Norton (2,4D+Picloram)
GST ($\text{U mg proteína}^{-1}$)	Fígado	528,0 \pm 38,31	518,0 \pm 38,83
	Brânquias	13,10 \pm 0,888	15,01 \pm 1,294
	Rim	27,28 \pm 2,756	29,44 \pm 2,725
GSH ($\text{nmol GSH mg proteína}^{-1}$)	Fígado	4,860 \pm 0,708	5,333 \pm 0,952
	Brânquias	31,04 \pm 1,955	30,71 \pm 2,233
	Rim	14,66 \pm 3,507	6,353 \pm 1,358
LPO ($\text{nmol mg proteína}^{-1}$)	Fígado	1,441 \pm 0,315	1,242 \pm 0,400
	Brânquias	0,949 \pm 0,342	0,845 \pm 0,156
	Rim	1,806 \pm 0,490	0,829 \pm 0,199

GST = glutatona S-transferase; GSH = glutatona; LPO = Lipoperoxidação.

3.4 Análises morfológicas

3.4.1 Rim

As alterações histopatológicas no rim de *P. brachypomus* estão evidenciadas na Tabela 3 e Figura 2. Os animais do grupo controle apresentaram glomérulos com espaço de Bowman bem definidos e túbulos rodeado por tecido intersticial, hematopoiético e linfóide (Figura 2A). As mudanças mais frequentes observadas foram as alterações da arquitetura renal e alterações celulares (Figura 2B-D). O I_{org} determinado, indica que as lesões no grupo exposto não foram significativas quando comparadas ao controle (Figura 5A).

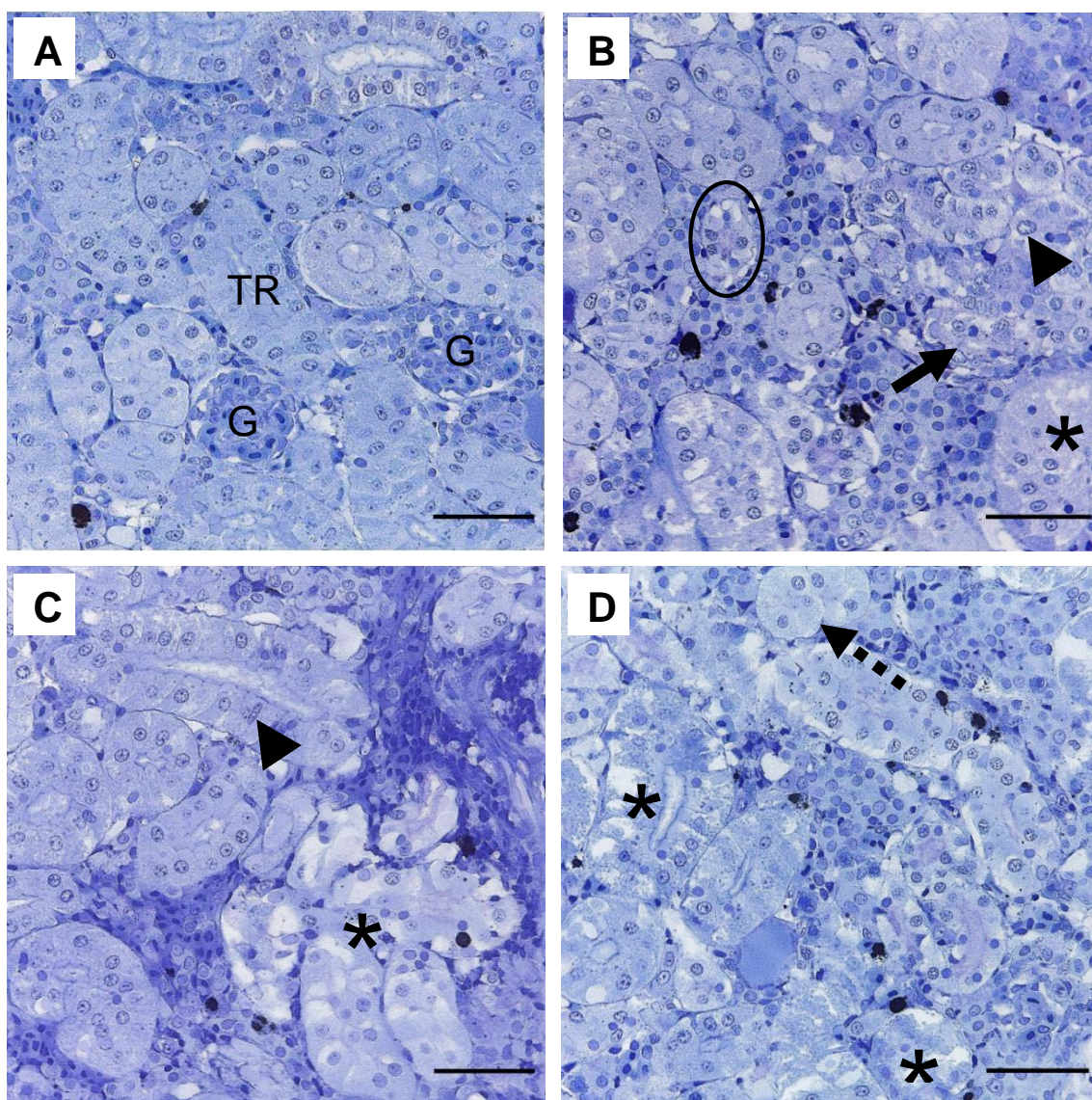


Figura 2 Histopatologias representativas no rim de *Piactus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) Controle. (B - D) rim de peixes expostos ao herbicida. Observe as alterações nucleares da célula tubular (cabeça de seta), atrofia do túbulo (círculo), desorganização tubular (seta); degenerações dos túbulos (*) e hipertrofia do túbulo (seta tracejada). G= glomérulo; TR= túbulos renais. Barra de escala= 20 μ m.

3.4.2 Fígado

Os efeitos da exposição ao herbicida comercial na histologia hepática estão mostrados na Tabela 3 e Figura 3. O grupo controle apresentou parênquima hepático característico e homogêneo, hepatócitos poligonais com núcleos esféricos e nucléolos centrais (Figura 3A). Após a exposição, foram observados danos como alteração na arquitetura dos hepatócitos (Figura 3B), atrofia e alterações nucleares (Figura 3B e D). O I_{org} do grupo exposto aumentou significativamente em comparação com o controle (Figura 5B).

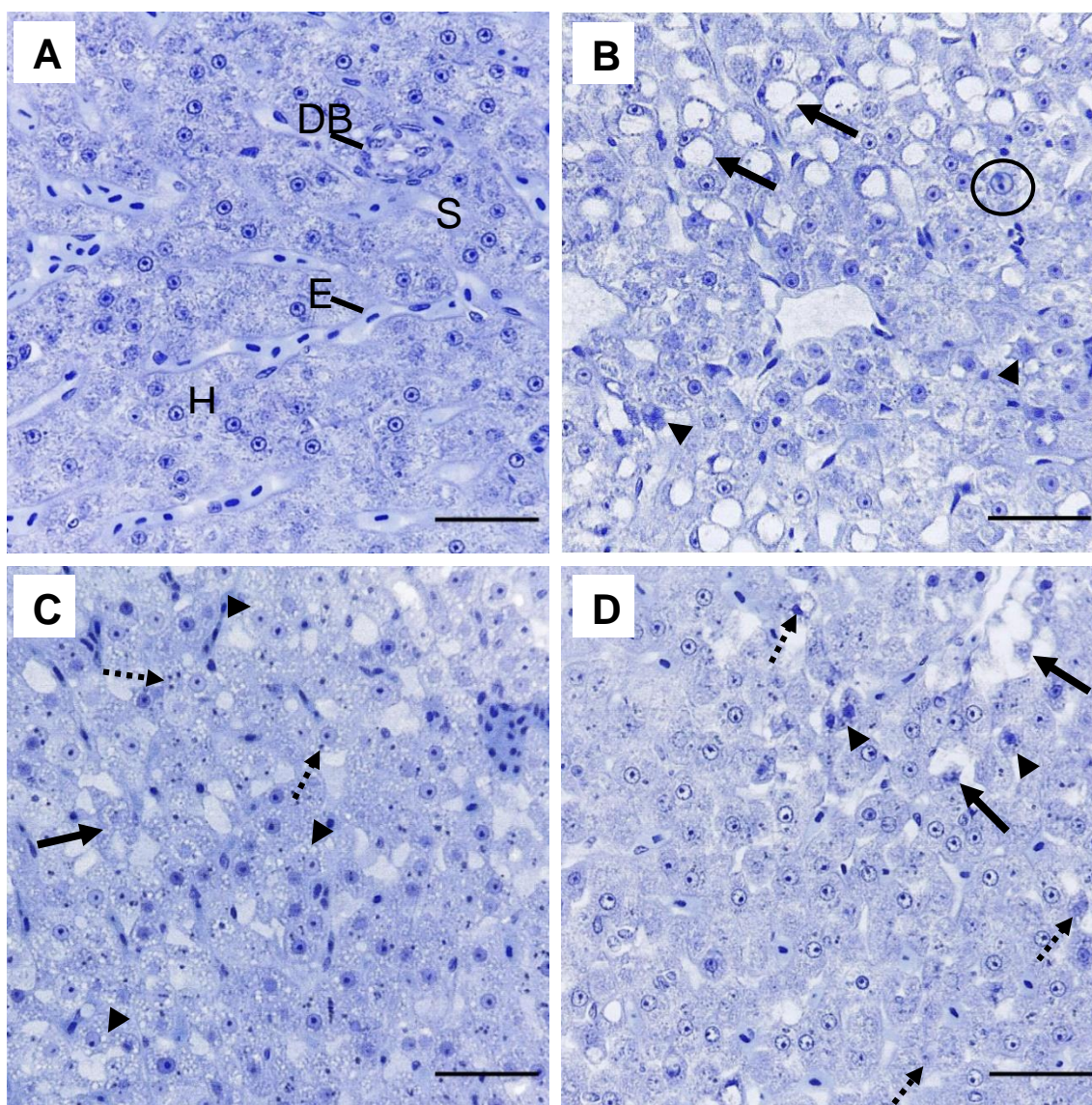


Figura 3 Histopatologias representativas no fígado de *Piarractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) Controle. (B - D) fígado de peixes expostos ao herbicida. Observe a alteração da arquitetura hepática com alteração nuclear (seta), atrofia dos hepatócitos (cabeça de seta) e hipertrofia nuclear (círculo) em B. Degeneração celular (seta), inclusões (seta pontilhada) e vacuolização (cabeça de seta) citoplasmáticas em C. Observe as alterações nucleares (seta pontilhadas), atrofia dos hepatócitos (cabeça de seta) e degeneração celular (seta) em D. DB= Ducto biliar; E= eritrócito; H= hepatócito e S= sinusoides. Barra de escala= 20 μ m.

3.4.3 Brânquias

As alterações histológicas branquiais estão mostrados na Tabela 3 e Figura 4. As características morfológicas gerais das brânquias de *P. brachypomus* do grupo controle apresentam epitélio lamelar pavimentoso sem alterações, células pilares estruturadas nas lamelas, sem impedimento de fluxo ou distúrbios circulatórios (Figura 4A). Após a exposição, houve alterações morfológicas branquiais, das quais incluíram constrição do sistema de células pilares e hipertrofia do epitélio lamelar (Figura 4B-D). O comprometimento morfofisiológico do tecido, evidenciado pelo índice de lesão do órgão (I_{org}), aumentado significativamente quando comparado ao grupo controle (Figura 5C).

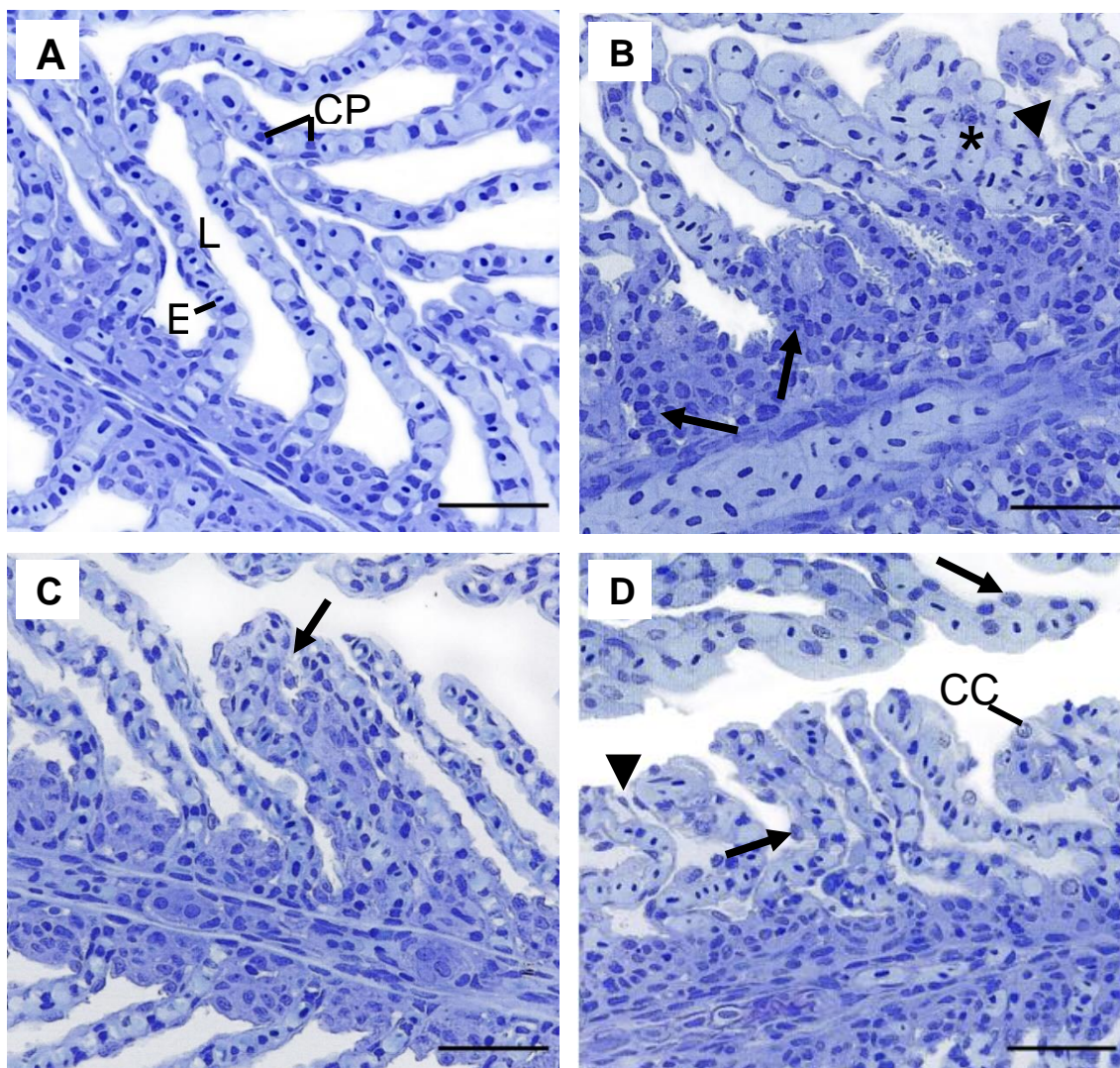


Figura 4 Histopatologias representativas nas brânquias de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h. (A) Controle. (B - D) Brânquia de peixes expostos ao Norton. Observe a constrição de células pilares (seta), congestão lamelar (*) e ruptura do epitélio (cabeça de seta) em B; hiperplasia (seta) em C; descolamento de epitélio (cabeça de seta) e hipertrofia celular (setas) em D. E= eritrócito; L= lamela; CP= células pilares; CC= célula cloreto. Barra de escala= 20 μ m.

Tabela 3 Índice de alteração individual (I_{alt}) de histopatologias encontradas em rim, fígado e brânquias de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 h.

Índice de Alteração Individual (I_{alt})	Fi	Exposição de 96 h	
		Controle	Norton 2,4D+Picloram)
<i>Patologias renais</i>			
Alteração da arquitetura e estrutura celular	1	1,000 ± 0,258	2,500 ± 0,223*
Acúmulos de substâncias intracelulares	1	1,167 ± 0,210	1,333 ± 0,210
Atrofia (túbulos e glomérulos)	2	1,000 ± 0,447	1,667 ± 0,333
Alterações nucleares do epitélio renal	2	2,667 ± 0,666	2,000 ± 0,000
Alterações do tecido intersticial	1	1,200 ± 0,200	1,200 ± 0,200
Hipertrofia dos túbulos	1	1,333 ± 0,210	1,167 ± 0,210
Hipertrofia dos glomérulos	1	0	0,166 ± 0,166
<i>Patologias hepáticas</i>			
Alteração da arquitetura e estrutura celular	2	0,500 ± 0,223	1,333 ± 0,210*
Alterações nucleares	1	1,000 ± 0,447	3,333 ± 0,843*
Atrofia celular	2	0,666 ± 0,421	4,000 ± 0,894*
Acúmulos de substâncias intracelulares	1	1,000 ± 0,258	0,500 ± 0,223
Degeneração citoplasmática	1	0,666 ± 0,210	0,666 ± 0,210
Hiperemia (sinusóides)	1	0,333 ± 0,210	0,166 ± 0,166
Hipertrofia dos hepatócitos		0,333 ± 0,210	0,166 ± 0,166
<i>Patologias branquiais</i>			
Células pilares (Constricção)	1	0,833 ± 0,166	2,833 ± 0,401*
Hipertrofia do epitélio lamelar	1	2,167 ± 0,542	3,833 ± 0,166*
Congestão/Hiperemia/Hemorragia	1	0,500 ± 0,223	0,666 ± 0,210
Hiperplasia do epitélio	1	1,000 ± 0,447	2,333 ± 0,333
Descolamento epitélio lamelar e edemas	1	2,500 ± 0,428	3,500 ± 0,223
Fusão parcial de lamelas	1	0	0,500 ± 0,223
Proliferação de células cloreto na lamela	1	1,000 ± 0,258	1,167 ± 0,401
Ruptura do epitélio	2	2,333 ± 0,333	4,167 ± 0,749

(*) indica diferença estatística em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Fi = Fator de importância.

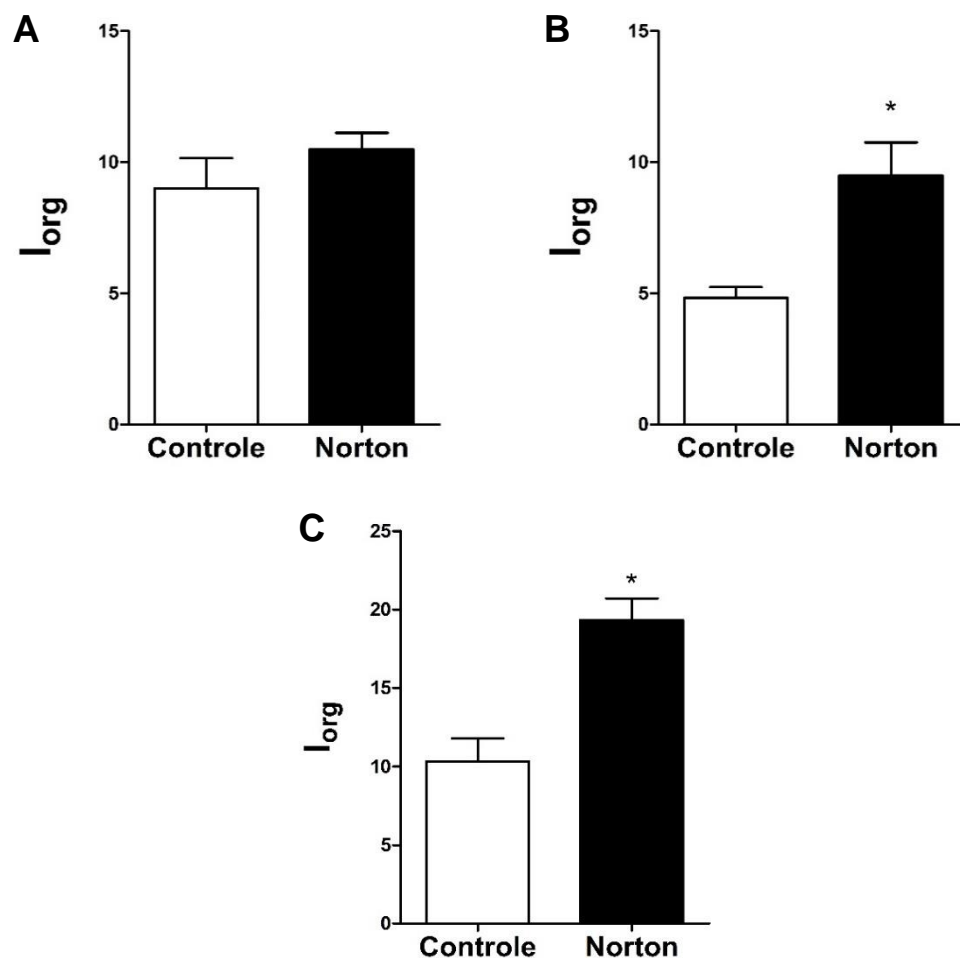


Figura 5 Índice de lesão do órgão (I_{org}) do rim (A), fígado (B) e brânquias (C) de *Piaractus brachypomus* exposto ao herbicida comercial Norton (2,4-D + Picloram) por 96 horas. (*) Indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

4 Discussão

A formulação comercial Norton (2,4-D+Picloram), mesmo em concentração subletal, demonstrou ser potencialmente tóxica para *P. brachypomus*. Os resultados do presente estudo indicaram que o herbicida induziu ajustes metabólicos nos organismos, verificados como estratégias adaptativas para manter a função celular diante das condições.

As mudanças morfológicas apresentadas no fígado dos peixes após a exposição, resultam da ação do herbicida sobre os tecidos. Portanto, a alteração da arquitetura hepática observada, pode indicar modificações no citoesqueleto, que geram a desorganização na distribuição das organelas e aumento do espaço intercelular e, assim, poderá influenciar nas interações entre os hepatócitos (Zhao et al., 1987). Esses efeitos negativos na forma celular, foram observados

em neurônios cultivados de ratos em resposta à ação do princípio ativo 2,4-D (Rosso et al., 2000). A atrofia dos hepatócitos evidenciada em *P. brachypomus* após a exposição ao herbicida Norton, compreende um mecanismo de adaptação. Segundo Safahieh et al. (2011), a atrofia é uma resposta decorrente da diminuição de funções especializadas da célula. No entanto, a persistência dessa patologia pode evoluir para lesões geralmente irreversíveis, como a necrose apoptótica ou oncolítica que, conseqüentemente, resultará na morte celular (Hinton et al., 2001).

Nesse estudo, a maioria das alterações nucleares e citoplasmática eram inespecíficas. Os núcleos hipertrofiados sugerem aumento do percentual de atividade celular enquanto que a vacuolização citoplasmática indica provável estágio inicial de degeneração (Takashima e Hibiya, 1995). Essas mudanças no tecido hepático foram relatadas em *Poecilia vivipara*, causadas pelo herbicida 2,4-D em formulação comercial após exposições subletais, das quais, as vacuolizações sinalizaram a presença de vesículas lipídicas no citoplasma (Vigário e Sabóia-Morais, 2014). Dessa forma, o I_{org} hepático calculado para *P. brachypomus*, sugere que as alterações hepáticas totais ocasionaram comprometimento do tecido e sua função.

A ação tóxica de compostos químicos, como os herbicidas, pode apresentar caráter hepatotóxico e comprometer a morfofisiologia do fígado em peixes. Assim, a análise plasmática das fosfatases ácidas e alcalinas concomitantes às transaminases, fazem-se necessárias para avaliar danos hepáticos em exposições subletais (Fathy et al., 2019). A diminuição da FAL plasmática em *P. brachypomus* após à exposição à concentração do herbicida, pode ser resultante de distúrbios no transporte transmembrana através da membrana dos hepatócitos. Devido essa enzima desempenha papel importante no transporte de fosforilados intermediários (Bernet et al., 2001).

As aminotransferases são primordiais para o metabolismo de aminoácidos e proteínas, sendo liberadas na circulação sanguínea após danos hepáticos (Ezenwaji et al., 2013). Nesse estudo, não foi evidenciado alterações na atividade de ambas aminotransferases em 96 horas, sugerindo que os organismos não apresentaram indícios de danos teciduais nas enzimas plasmáticas. De acordo com as observações de Gallagher e Digiulio (1991),

bagres (*I. punctatus*) expostos à mistura dos ingredientes ativos 2,4-D + picloram evidenciaram maior taxa metabólica e os níveis normais de ALT não confirmaram danos hepáticos.

Os carboidratos são usualmente a fonte primária de energia em casos de estresse, a exposição a pesticidas podem causar redução tanto nos níveis de glicogênio muscular quanto glicogênio hepático (Hori et al., 2006). No presente estudo observou-se a depleção de estoque de glicogênio no músculo e o aumento de glicose plasmática apresentadas em *P. brachypomus* expostos por 96 horas ao xenobiótico, provavelmente um processo de gliconeogênese, sendo utilizado como fonte energética no tecido muscular.

Venturini (2010) relatou em seu trabalho que o pacu reduziu os níveis de glicogênio hepático e muscular após exposição por 96 horas ao organofosforado trichlorfon, e mesmo após sete dias de recuperação ao herbicida, os animais permaneceram com os índices de glicogênio baixo, o autor relaciona este resultado ao processo de glicogenólise, pois a glicemia estava elevada e, após 14 dias de recuperação há um aumento no glicogênio, retornando aos níveis do controle, associando assim a um processo de recuperação.

A degradação de glicogênio muscular pode estar associada ao aumento dos níveis de acetilcolina no músculo, em caso de inibição da acetilcolinesterase (AChE) (Sastry e Siddiqui, 1982), pois a secreção de catecolaminas consequente desse processo, promove uma maior glicogenólise para atender a demanda muscular de ATP, requerida pela elevação da atividade locomotora (Martinez-Porchas et al., 2009). Dessa forma, estudos anteriores evidenciaram que o herbicida comercial Norton à base de 2,4-D + Picloram foi capaz de gerar distúrbios locomotores e inibir a atividade da AChE no músculo de *P. brachypomus* após exposição à concentração subletal (Dados não publicados).

No entanto, a necessidade de glicose em peixes pode ser atendida a partir da hidrólise de glicogênio hepático e também a partir de precursores como lactato, aminoácidos e piruvato (gliconeogênese) (Li et al., 2018). Por isso, é necessário ressaltar que a degradação do glicogênio muscular no presente estudo, não contribuiu diretamente para o aumento dos níveis de glicose plasmática. Mas, segundo Begg e Pankhurst (2004) o lactato (subproduto do glicogênio muscular) pode servir de substrato na síntese de

glicose e também e pode contribuir para preservação dos estoques de glicogênio no fígado. Respostas similares foram observados em *Cyprinus carpio*, expostos a 2,4-diamina (derivado de 2,4-D), que sugeriram um mecanismo de ajuste para suprir a demanda de energia, decorrente de um estado de hipóxia gerado pelo composto (Oruç e Üner, 1999).

As alterações na estrutura branquial de peixes geradas por herbicidas, podem interferir no funcionamento adequado do órgão e, geralmente, são decorrentes de mudanças bioquímicas e fisiológicas (Fernandes e Mazon, 2003). Algumas patologias foram significativamente mais frequentes nos organismos expostos ao herbicida Norton, como a hipertrofia de células do epitélio lamelar. Essas alterações são mecanismos de defesa que aumentam a distância água-sangue e reduzem o espaço interlamelar para, assim, evitar a absorção de substâncias tóxicas. Entretanto, pode ocorrer uma diminuição da área de superfície respiratória resultante desse processo, restringindo a troca gasosa e também levando à disfunção osmorregulatória (Sakuragui et al., 2003). Tais patologias foram observadas em *Clarias gariepinus* expostas à formulação comercial de 2,4-D – amina (Makinde et al., 2015) e em *Ctenopharyngodon idella* expostas às concentrações de Picloram (Botelho et al., 2012).

A constrição no sistema de células pilares decorrentes da exposição de *P. brachypomus* ao herbicida Norton, resultou em distúrbios circulatórios. Essas alterações também interferem nas trocas gasosas e podem gerar descolamento do epitélio lamelar (Sachi et al., 2021). Considerando todas as alterações branquiais, o I_{org} indicou que as lesões apresentadas no tecido branquial de *P. brachypomus* gerou disfunções do órgão após o período de 96 horas de exposição. Essas alterações morfológicas podem representar estratégias adaptativas para conservação das funções fisiológicas.

As análises histológicas juntamente com informações funcionais, permitem uma descrição mais ampla dos efeitos de um composto sobre os peixes (Ribeiro et al., 2018). A amônia consiste no principal produto da excreção dos teleósteos, e é derivada da digestão das proteínas e do catabolismo dos aminoácidos, principalmente no fígado. Esse composto nitrogenado é transportado para as brânquias, órgão que realiza a maior parte da sua eliminação (Randall e Wright, 1987). Nesse estudo, não foram observados

alterações nos níveis de amônia plasmática, sugerindo que as histopatologias branquiais decorrentes da exposição não afetaram sua função excretora.

Em peixes, o rim é um órgão frequentemente associado às alterações morfológicas diante de estressores (Carmo et al., 2018). Nesse estudo, as alterações da arquitetura renal e alterações celulares estruturais observadas no rim de *P. brachypomus*, são decorrentes do aspecto degenerado e desorganizado das células tubulares. Essas condições podem estar relacionadas com o estágio inicial do processo de degeneração granular, o qual exhibe contorno celular indefinido, hipertrofia das células epiteliais tubulares e diminuição do calibre do lúmen. Tais alterações podem prejudicar a passagem do filtrado e comprometem o processo de reabsorção e secreção tubular (Camargo e Martinez, 2007). No entanto, são consideradas reversíveis (Hinton e Lauren, 1990; Silva e Martinez, 2007). De acordo com as observações feitas por Gallagher e Digiulio (1991), a combinação de 2,4-D e picloram gerou lesões nos túbulos proximais do rim de *I. punctatus* expostos a concentrações subletais, indicando que a combinação dos ingredientes ativos ocasionou efeitos tóxicos no tecido. No presente estudo, o I_{org} indicou que as patologias totais apresentadas não promoveram comprometimento da função do órgão.

Os rins realizam papel fundamental na excreção de xenobióticos, assim como no equilíbrio iônico e hídrico. Devido à isso, elimina compostos químicos durante o curso de formação da urina, por meio da filtração glomerular, reabsorção ou secreção tubular (Carmo et al., 2018). A diminuição da proteína plasmática em *P. brachypomus* após o período de exposição subletal, pode estar relacionada com o processo de eliminação de proteínas na urina (proteinúria), o que indica que as alterações morfológicas observadas (I_{ait}) podem ter ocasionado prejuízos mesmo sem comprometer a função total rim (I_{org}). Em embriões de *Danio rerio* expostos ao herbicida comercial Tordon (2,4-D + picloram), foi observado a redução significativa da quantidade de proteína total (corporal), sendo um efeito atribuído à proteinúria (Gomes, 2017).

O uso dos biomarcadores de biotransformação e danos celulares fazem parte dos métodos amplamente utilizados para avaliar os efeitos dos poluentes sobre os peixes (Bonomo et al., 2021). O sistema GST-GSH atua na fase II da desintoxicação, conjugando os metabólitos produzidos pela fase I de

biotransformação. Após a conjugação dos compostos tóxicos, o produto gerado é capaz de ser excretado da célula sem provocar danos celular potencial, como a peroxidação lipídica (Huang et al., 2020). No presente estudo, não houveram alterações no sistema enzimático (GST-GSH) dos tecidos estudados, sendo brânquias, fígado e rim. Isso sugere que o composto não afetou a capacidade de detoxificação do sistema de defesa antioxidante e, dessa forma, foi possível conter os efeitos do estresse oxidativo. Resultados semelhantes foram observados por Gallagher e Digiulio (1991) em fígado de peixes-gato (*I. punctatus*) expostos à mistura de 2,4-D e picloram, dos quais não apresentaram mudanças na atividade da GST.

Em concordância aos resultados apresentados pelo sistema GST-GSH nesse estudo, os níveis inalterados de LPO nos órgãos analisados de *P. brachypomus* após a exposição, indicam que os oxidantes não promoveram a quebra significativa de fosfolípidios da membrana. Condições que poderiam provocar danos severos nas propriedades das células caso acontecessem (Srivastava e Reddy, 2017). No entanto, Salla et al. (2019) observou que as interações do 2,4-D e do picloram com a bicamada lipídica da membrana dos hepatócitos de ratos Wistars, podem ser altamente destrutivo e pode estar relacionado à toxicidade celular desses princípios ativos. Contudo, vale frisar que as diferenças das respostas biológica diante de herbicidas, se dão por vários fatores, como a via de exposição, formulação utilizada e espécie submetida (Islam et al., 2008).

5 Conclusão

Os resultados sugerem que a exposição ao herbicida Norton (2,4-D + picloram) na concentração testada em 96 horas, resultou em mudanças morfofisiológicas que comprometem funções do tecido hepático, branquial e renal em *Piaractus brachypomus*. As lesões hepáticas observadas indicaram condições de ajustes do fígado, no entanto, algumas patologias descritas podem evoluir para lesões geralmente irreversíveis. Dessa forma, as alterações totais indicaram comprometimento do fígado. Os resultados mostraram disfunção no metabolismo de carboidratos, sendo essas, condições desencadeadas para atender a demanda energética muscular. As alterações morfológicas

evidenciadas nas brânquias demonstraram estratégias adaptativas para conservação das funções fisiológicas, das quais mantiveram a função excretora do órgão. No entanto, as patologias apresentadas estão relacionadas a restrição de processos vitais e apontam o comprometimento das brânquias. No tecido renal, as lesões morfológicas individuais verificadas não comprometeram a função total do rim, entretanto, foram capazes de ocasionar prejuízos associados à proteinúria. Nos órgãos analisados, a via de biotransformação de fase II (GST-GSH) e a LPO evidenciaram que o composto não excedeu a capacidade de detoxificação do sistema de defesa antioxidante, diminuindo os efeitos do estresse oxidativo. Dessa forma, a integração de biomarcadores possibilitaram a mensuração das respostas morfofisiológicas em *P. brachypomus*, decorrentes da exposição ao herbicida, contribuindo para a verificação da saúde dos organismos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe do Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da Universidade Federal do Tocantins e do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, SP. A autora Kamilla Pereira da Silva agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa recebida.

CAPÍTULO 4- Considerações Finais

Considerações Finais

No presente trabalho, a integralização de múltiplos biomarcadores na avaliação do potencial toxicológico do herbicida Norton (2,4-D + picloram) em *Piaractus brachypomus*, permitiu concluir que o valor determinado da CL₅₀ em 96 horas foi classificado como minimamente tóxica, por estar em concentração acima de 100 mg L⁻¹. Entretanto, a exposição subletal aguda (96h) na concentração de 1,11 g L⁻¹ do produto, afetou o sistema neuromuscular nos organismos, gerando alterações comportamentais como consequências da inibição da AChE no músculo, evidenciando efeitos neurotóxicos que comprometem funções locomotoras e sensoriais.

As variáveis hematológicas indicaram um quadro de anemia macrocítica, reconhecido como resposta compensatória para mantimento dos níveis adequados no transporte de oxigênio. No que se refere aos biomarcadores citogenotóxicos, houve baixa frequência de MN em eritrócitos de *P. brachypomus*, indicando que o herbicida não gerou efeitos clastogênicos durante o período experimental. No entanto, essa resposta pode estar relacionada ao atraso na síntese de DNA durante a eritropoiese que, conseqüentemente, gerou a anemia macrocítica nos animais. Devido essa condição afetar a normalidade do ciclo celular.

A exposição subletal aguda ocasionou comprometimento morfofuncional em órgãos de *P. brachypomus*. O fígado apresentou patologias comuns em condições de ajustes, no entanto, algumas dessas alterações podem evoluir para lesões geralmente irreversíveis, caso persistam. Com isso, as alterações totais indicaram comprometimento do tecido hepático. Além disso, os biomarcadores evidenciaram distúrbio no metabolismo de carboidratos, que foram desencadeados para suprir a demanda energética muscular, gerada por reações neurotóxicas a partir da inibição da AChE. As alterações morfológicas branquiais apontam o comprometimento do tecido, das quais são decorrentes de mecanismo de adaptação para manter suas funções e evitarem ação direta do

agente tóxico. No rim, as lesões morfológicas verificadas não comprometeram a sua função, mas foram capazes de ocasionar prejuízos específicos.

O sistema enzimático de desintoxicação (GSH/GST) e a LPO no fígado, brônquias e rim, mostraram que a exposição ao herbicida não excedeu a capacidade de detoxificação do sistema de defesa antioxidante e foi possível evitar os efeitos do estresse oxidativo.

Referências

- Badroo, I.A., Nandurkar, H.P., Khanday, A.H., 2020. Toxicological impacts of herbicide paraquat dichloride on histological profile (gills, liver, and kidney) of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 39054–39067.
- Begg, K., Pankhurst, N.W., 2004. Endocrine and metabolic responses to stress in a laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *J. Fish Biol.* 64,133–145.
- Bernet, D., Schimidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.* 22, 25–34.
- Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T., Burkhardt-Holm, P., 2001. Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta L.*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48(2),140–147.
- Bidinoto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water fish: a procedure for field determination of microsamples. *Bol. Tec. CEPTA.* 10, 53-60.
- Blakley, P. M., Kim, J. S., Firneisz, G. D., 1989. Effects of paternal subacute exposure to tordon 202c on fetal growth and development in CD-1 mice. *Teratol.* 39(3), 237–241.
- Bonomo, M. M., Teresa de Castro Sachi, I., Paulino, M. G., Fernandes, J. B., Carlos, R. M., Fernandes, M. N., 2020. Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. *Environ. Poll.* 115758.
- Botelho, R.G., Santos, J.B., Fernandes, K.M., Neves, C.A., 2012. Effects of atrazine and picloram on grass carp: acute toxicity and histological assessment. *Toxicol. Environ. Chem.* 94,121–127.
- Caldeira, D. S. A. Amaral, V. N., Casadei, R. A., Barros, L. V., Figueiredo, Z. N., 2014. Controle de plantas daninhas em pastagem usando doses e misturas de herbicidas. *Encicl. Biosf.* 10, 1052-1060.
- Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5, 327–336.
- Cattaneo, R., Loro, V. L., Spanevello, R., Silveira, F. A., Luz, L., Miron, D. S., Clasen, B., 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pest. Bioch. and Physiol.* 92(3),

133–137.

Carmo, T. L. L., Azevedo, V. C., Siqueira, P. R., Galvão, T. D., Santos, F. A., dos Reis Martinez, C. B., Appoloni, C.R., Fernandes, M. N., 2018. Reactive oxygen species and other biochemical and morphological biomarkers in the gills and kidneys of the Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*, exposed to titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Environ. Sci. and Poll. Res.* 25(23), 22963–22976.

Donald, D.B., Cessna, A.J., Sverko, E., Glozier, N.E., 2007. Pesticides in surface drinking-water supplies of the Northern Great plains. *Environ. Health. Perspect.* 115,1183–1190.

Evans, D. H., 1993. *The Physiology of Fish*. B. Raton, 99-136.

Ezenwaji, N.E., Bebe, Y., Nwaigwe, C., 2013. Changes in liver and plasma enzymes of *Clarias gariepinus* exposed to sublethal concentrations of diesel. *Afr. J. Biotechnol.* 12(4), 414–418.

Fathy, M., Mohamed, I.A., Farghal, A.I., Temerak, S.A., Sayed, A.E.D.H., 2019. Hemotoxic effects of some herbicides on juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Environ. Sci. and Poll. Res.* 26(30), 30857-30865.

Fernandes, M.N., Mazon, A.F., 2003. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val., A.L., Kapoor, B.G. (Eds.), *In Fish Adaptations*. Sci. Publi., Inc., 422, 203–231.

Gallagher, E., Digiulio, R., 1991. Effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicol. Lett.* 57(1), 65–72.

Gentzkow, C.J., Masen, J.M., 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. Biol. Chem.* 143, 531-544.

Gomes, D.S.F., 2017. Os efeitos do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e do Tordon® no desenvolvimento embrionário e no metabolismo energético do peixe-zebra (*danio rerio*). Dissertação (Mestrado em Produtos e Bioativos e Biociências). Uni. Federal do Rio de Janeiro, 81p.

Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione Stransferases. *Methods Enzymol.* 77, 398–405.

Hinton, D.E., Lauren, D.J., 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *Am. Fish Soc. Symp.* 8, 51–66.

Hinton, D.E., Segner, H., Braunbeck, T., 2001. Toxic responses of the liver. In: Schlenk D, Bensen WH (eds) Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, Vol. 1. London: Taylor and Francis, 224–268.

Hori, T. S. F., Avilez, I. M., Inoue, L. K. Moraes, G., 2006. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 67 – 72.

Huang, X., Li, Y., Wang, T., Liu, H., Shi, J., Zhang, X., 2020. Evaluation of the Oxidative Stress Status in Zebrafish (*Danio rerio*) Liver Induced by Three Typical Organic UV Filters (BP-4, PABA and PBSA). *Internat. J. of Environ. Res. and Pub. Health.* 17(2), 651.

Husak, V.V., Mosiichuk, N.M., Maksymiv, I.V., Sluchyk, I.Y., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2014. Histopathological and biochemical changes in goldfish kidney due to exposure to the herbicide Sencor may be related to induction of oxidative stress. *Aquat Toxicol.* 155, 181–189.

Jiang, Z., Ahn, D. U., Ladner, L., Sim, J.S., 1992. Influence of feeding full-fat flax and sunflower seeds on internal and sensory qualities of eggs. *Poult. Sci.* 71 (2), 378–382.

Kruger, N.J., 1994. The Bradford method for protein quantification. *Methods Mol Biol.* 32, 9–15.

Leão, M.B., Gonçalves, D.F., Miranda, G.M., da Paixão, G.M.X., Dalla Corte, C.L., 2019. Toxicological evaluation of the herbicide Palace® in *Drosophila melanogaster*. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 82, 1172– 1185.

Li, H., Xu, W., Jin, J., Yang, Y., Zhu, X., Han, D., Liu, H., Xie, S., 2018. Effects of starvation on glucose and lipid metabolism in gibel carp (*Carassius auratus* gibel var. CAS III). *Aqua.* 496, 166–175.

Makinde, G.E.O., Olaifa, F.E. and Bajo, O.T., 2015. Acute toxicity and histopathological Changes in gill and liver of catfish (*Clarias garipinus*) exposed to 2, 4- D Amine (Herbex D' SI). *J. of Bio. Agric. and Heal.* 5(4): 145-149.

Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., Ramos-Enriquez, R., 2009. Cortisol and glucose: reliable indicators of stress? *Pan. Am. J. Aquat. Sci.* 4, 158–178.

Moron, S. E., Oba, E. T., De Andrade, C. A., Fernandes, M. N., 2003. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerthrinus unitaeniatus*. *J. of Experim. Zoo.* 298A(2), 93–104.

Oakes, D.; Pollak, J., 1999. Effects of a herbicide formulation, Tordon 75D®, and its individual components on the oxidative functions of mitochondria. *Toxicol.* 136, 41–52.

Oruç, E.O., Üner, N., 1999. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environ. Pollut.* 105, 267–272.

Ozer, J.; Ratner, M.; Shaw, M.; Bailey, W.; Schomaker, S., 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicol.* 245,194-205.

Paulino, M. G., Tavares, D., Terezan, A. P., Sakuragui, M. M., Pesenti, E., Giani, A., Cestari, M.M., Fernandes, J.B., Fernandes, M. N., 2020. Biotransformations, antioxidant system responses and histopathological indexes in the liver of fish exposed to cyanobacterial extract. *Environ. Toxic. and Chem.* 39, 1041–1051.

Paulino, M.G., Rossi, P.A., Venturini, F.P., Tavares, D., Souza, N.E.S., Sakuragui, M.M, Moraes, G., Terezan, A.P., Fernandes, J.B., Gian, A., Fernandes, M.N., 2017. Hepatotoxicity and metabolic effects of cellular extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* containing microcystins RR and YR on neotropical fish (*Hoplias malabaricus*). *Chemosphere.* 175, 431–439.

Randall, D.J., Wright, P.A., 1987. Ammonia distribution and secretion in fish. *Fish Physiol. and Bioch.* 3(3), 107-120.

Ribeiro, M.C.; Moron, S.E.; Lopes, J. M, 2018. Histological analysis of *Bryconops caudomaculatus* gills and liver under different concentrations of ammonia. *Bol. do Inst. de Pesca.* 43, 35-43.

Rigotto, R.M., Vasconcelos, D.P., Rocha, M. M., 2014. Pesticide use in Brazil and problems for public health. *Cad. Saúde Pub.* 30, 1360-1362.

Rosso, S.B., Caceres, A.O., de Duffard, A.M., Duffard, R.O., Quiroga, S., 2000. 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid disrupts the cytoskeleton and disorganizes the Golgi apparatus of cultured neurons. *Toxicol Sci.* 56, 133-140.

Sachi, I. T. C., Bonomo, M. M., Sakuragui, M. M., Modena, P. Z., Paulino, M. G., Carlos, R. M., Fernandes, J.B, Fernandes, M. N., 2021. Biochemical and morphological biomarker responses in the gills of a Neotropical fish exposed to a new flavonoid metal-insecticide. *Ecotoxicol. and Environ. Safety.* 208, 111459.

Safahieh, A., Hedayati, A., Savari, A., Movahedinia, A., 2011. Effect of sublethal dose of mercury toxicity on liver cells and tissue of yellowfin seabream. *Toxicol Ind Health.* 28, 583–592.

- Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Souza, N.E.S., Tavares, D., Terezan, A.P., Pesenti, E., Giani, A., Fernandes, J.B., Cestari, M.M., Fernandes, M.N., 2019. Crude extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi* strain R28 induces anemia and oxidative stress in fish erythrocytes. *Toxicol.* 169, 18–24.
- Sakuragui, M.M., Sanches, J.R., Fernandes, M.N., 2003. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol.* 173, 309–317.
- Salla, B.G.F., Bracht, L., Parizotto, V.A., Comar, J.F., Peralta, R.M., Bracht, F., Bracht, A., 2019. Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2,4-D and picloram in the liver. *Toxicol. Lett.* 313, 137–149.
- Sastry, K., Siddiqui, A., 1982. Chronic toxic effects of the carbamate pesticide sevin on carbohydrate metabolism in a freshwater snakehead fish, *Channa punctatus*. *Toxicol. Lett.* 14(1-2), 123–130.
- Silva, A.G., Martinez, C.B.R., 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23(2), 185–192.
- Srivastava, B., Reddy, P. B., 2017. Lipid peroxidation and DNA damage as biomarkers of pollution induced oxidative stress in fish. *Life Sci. Int. J.* 4(1), 194-198.
- Takashima, F., Hibiya, T., 1995. *An Atlas of Fish Hittology. Normal and Pathological Features.* Gustav. Fisher. Verlag.195.
- Tavares, D., Paulino, M.G., Terezan, A.P., Fernandes, J.B., Giani, A., Fernandes, M.N., 2018. Biochemical and morphological biomarkers of the liver damage in the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*, injected with crude extract of cyanobacterium *Radiocystis fernandoi*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 15349-15356.
- Van der Oos, R., Beyer, J., Vermeulen, P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Venturini, F. P., 2010. Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) exposto à concentração sub-letal de triclorfon e recuperação. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, 90f.
- Vigário, A.F, Sabóia-Morais, S.M.T., 2014. Effects of the 2,4- D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. *Pesq. Vet. Bras.* 34(6), 523-528.

White. C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence- based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* 318, 175–180.

Zhao, Y., Li, W., Chou, L., 1987. Cytoskeletal perturbation induced by herbicides, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-t). *J. of Toxicol. and Environ. Health.* 20(1-2), 11–26.