

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA LUIZA PEREIRA ARAÚJO

**O EFEITO DO PESTICIDA METIL-PARATION EM *Astyanax altiparanae*  
(LAMBARI) POR MEIO DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.**

CURITIBA

2009

MARIA LUIZA PEREIRA ARAÚJO

**O EFEITO DO PESTICIDA METIL-PARATION EM *Astyanax altiparanae*  
(LAMBARI) POR MEIO DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.**

Monografia apresentada ao Departamento de  
Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
Parcial à obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas,

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira  
Ribeiro

CURITIBA

2009

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, pela orientação, paciência, apoio, incentivo e amizade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Paraná, na UFPR e as técnicas Vera Regina Fontana Pionteke e Rosângela Borges Freitas.

A prof. Dr<sup>a</sup>. Marisa Fernandes Castilho, no Departamento de Ciências Fisiológicas, pela atenção e disponibilidade.

A prof. Dr<sup>a</sup>. Helena Cristina da Silva de Assis, no departamento de Farmacologia, pela utilização do laboratório, juntamente a Cris e ao César, pela ajuda nas análises.

Ao pessoal do Laboratório de Toxicologia Celular, Dani, Loli, Daniel, Chuli, Flavio, Samuel, Inês, Rodrigo, Chico pelos momentos de descontração, apoio e ajuda nos momentos difíceis.

Aos meus pais Alberto e Regina, e ao meu irmão Guilherme, pelo eterno apoio, carinho, compreensão e principalmente paciência nessa longa jornada fora de casa.

A minha família, que mesmo longe, sempre me apoiaram em tudo.

Aos meus amigos da universidade, Ângela, Lívia, Alline, Silvia, Melissa, Rafaela, Tatiane, Nédia, Cibelle, Laercio, Luigi, Fernanda, Jôciele, Mariane, pela enorme amizade, confiança e alegria durante todo esse tempo.

Aos meus amigos da França, Raissa, Nina, Wanessa, Karla, Vinicius, Cécile, John, que não me deixaram desistir.

## RESUMO

Como a cada dia são lançados vários novos produtos químicos no mercado, e pouco se sabe sobre o potencial destes compostos nos ambientes naturais, devemos estudá-los com mais atenção. Os ecossistemas aquáticos (lagos, rios e oceanos) geralmente funcionam como receptáculos finais destes compostos ou elementos químicos lançados no ambiente natural. A aplicação de inseticidas em áreas cultivadas pode resultar em contaminação do ambiente aquático, sendo que a concentração da maioria deles em água é baixa, em parte devido ao fato de serem geralmente pouco solúveis e em parte, devido ao efeito da diluição, mas mesmo em concentrações baixas, os inseticidas apresentam grandes riscos para espécies de organismos aquáticos. O Metil-Paration é um dos inseticidas organofosforado utilizados em larga escala em diversos países. Os peixes podem estar constantemente sujeitos à exposição ao Metil-Paration, seja acidental ou em condições de tratamento em tanques de criação. As brânquias, assim como a pele, são os primeiros órgãos a serem atingidos em casos de poluição aquática. A presença de poluentes no ambiente aquático pode interferir na funcionalidade do tecido branquial causando alterações na via respiratória dos peixes. A acetilcolinesterase é a enzima presente na maioria das sinapses químicas. Ela é responsável pela hidrólise e remoção do neurotransmissor, à medida que diminui a quantidade de substâncias transmissora, o potencial pós-sináptico geralmente diminui. As alterações morfológicas encontradas nas brânquias foram as seguintes: hiperplasia, hipertrofia, fusão parcial, fusão total e alteração estrutural das microdigitações. Houve uma inibição significativa da atividade da Acetilcolinesterase no grupo contaminado com 0,25 ppm e 0,5 ppm de Metil-Paration para o grupo controle mostrando uma inibição dose dependente, sendo que os dois grupos se diferenciam em entre si.

Palavras-Chave: Metil-Paration, *Astyanax altiparanae*, brânquias, Acetilcolinesterase

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Metil-Paration. ....	3
Figura 2 - <i>Astyanax altiparanae</i> (Lambari).....	8
Figura 3 – Brânquias de <i>Astyanax altiparanae</i> . Grupo controle.....	16
Figura 4 – Brânquias de <i>Astyanax altiparanae</i> exposto a 0,25 ppm de Metil-Paration, após 7 dias de exposição.....	17
Figura 5 – Brânquias de <i>Astyanax altiparanae</i> exposto a 0,5 ppm de Metil-Paration, após 7 dias de exposição.....	18
Figura 6 – Atividade da acetilcolinesterase muscular em <i>Astyanax altiparanae</i> expostos ao Metil-Paration por 7 dias.....	19

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Freqüência das alterações encontradas nas brânquias do grupo controle e dos grupos expostos a 0,25 ppm e 0,5 ppm de Metil-Paration após 7 dias. ....	13
Tabela 2 - Ocorrência das alterações nos indivíduos do grupo controle. ....	14
Tabela 3 - Ocorrência das alterações nos indivíduos do grupo contaminado a 0,25 ppm com Metil-Paration, após 7 dias de exposição. ....	14
Tabela 4 - Ocorrência das alterações nos indivíduos do grupo contaminado a 0,5 ppm com Metil-Paration, após 7 dias de exposição. ....	15

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1 Pesticidas .....	1
1.2 Metil-Paration.....	3
1.3 Brânquias.....	4
1.4 Acetilcolinesterase (AChE) .....	5
1.4 Biomarcadores.....	6
2. Objetivos .....	7
2.1 Objetivo Geral .....	7
2.2 Objetivo Específico .....	7
3. Materiais e Métodos .....	8
3.1 Animais .....	8
3.2 Desenho Experimental.....	9
3.3 Utilização de brânquias na microscopia eletrônica de varredura .....	9
3.4 Método bioquímico de avaliação da Acetilcolinesterase.....	10
4. Resultados .....	12
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em brânquias .....	12
Atividade da AChE em músculoaxial de <i>Astyanax altiparanae</i> .....	19
5. Discussão.....	20
6. Conclusões.....	25
7. Referências .....	26

## **1. Introdução**

O estudo dos impactos causados por poluentes no ambiente aquático como um todo e, especialmente, nos organismos animais e vegetais que o compõem, tem tomado grandes proporções nos últimos anos. Isso se deve ao aumento da presença e quantidade de agente tóxicos nesses ambientes e do conseqüente aumento da preocupação com o papel desses poluentes para a sobrevivência das espécies diretamente atingidas e da própria espécie humana enquanto consumidora desses organismos.

Como a cada dia são lançados vários novos produtos químicos no mercado, e pouco se sabe sobre o potencial destes compostos nos ambientes naturais, estes devem ser estudados com mais atenção.

Os ecossistemas aquáticos (lagos, rios e oceanos) geralmente funcionam como receptáculos finais destes compostos ou elementos químicos lançados no ambiente natural. Dependendo das condições físicas e químicas desses ambientes, tais substâncias podem ser neutralizadas, modificadas através de reações químicas e/ou biotransformadas, podendo assim, aumentar sua biodisponibilidade e conseqüentemente seu potencial tóxico (RABITTO, 2003).

A ictiofauna constitui um recurso alimentar importante, sendo uma fonte protéica acessível através da exploração direta das populações naturais (MONTEIRO, 2006) ou proveniente de cultivos, sendo assim é importante estudar os efeitos de xenobioticos nesses indivíduos.

### ***1.1 Pesticidas***

De acordo com MOREIRA *et al.* (2002) o Brasil ocupa hoje a quarta posição no ranking dos países consumidores de agrotóxicos. Para garantir a eficiência dessa atividade, os empresários e produtores rurais muitas vezes utilizam agrotóxicos com o intuito de maximizar suas produções, possuindo lavouras altamente dependentes de produtos químicos, incluindo os pesticidas. Apesar dos benefícios que os pesticidas podem ocasionar, o problema de intoxicação por defensivos agrícolas é preocupante, especialmente pelo fato de que a intoxicação acontece pela ingestão

gradativa destes produtos que contaminam a água, o solo e uma variedade de alimentos (RISSATO *et al.*, 2004).

A aplicação de pesticidas em áreas cultivadas pode resultar em contaminação do ambiente aquático por meio de derramamentos acidentais, lavagem do solo pela chuva, lavagem de equipamentos e recipientes utilizados nas aplicações, descarga de efluentes industriais ou de atividades agrícolas, transporte de partículas de solo contaminadas através de erosão, entre outros (ALTOE, 1992).

O uso de muitos destes compostos foi proibido devido à constatação do efeito cumulativo e prejudicial em organismos vivos, além disso, a administração desses produtos nem sempre é efetuada de forma controlada, sendo que seu uso indiscriminado, mesmo de forma profilática, pode trazer conseqüências gravíssimas aos animais e ao ambiente (MONTEIRO, 2006).

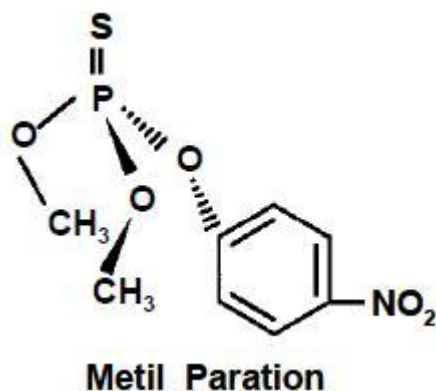
Uma vez liberados no ambiente, os pesticidas podem ter diferentes destinos, tais como solo e águas, residuais ou subterrâneas, podendo também ser transportados por longas distâncias devido aos processos naturais de movimento das águas superficiais, contaminando recursos hídricos importantes. Nas águas, estes compostos podem ser adsorvidos ao material em suspensão, depositados no sedimento ou incorporados por organismos, podendo ser acumulados, metabolizados e excretados (ALBANIS *et al.*, 1998).

De acordo com ABOU-ARAB (1996), uma das características indesejáveis de alguns inseticidas, do ponto de vista ambiental, é a persistência, que consiste na capacidade das substâncias em permanecer inalteradas e ativas por muito tempo na água.

A concentração da maioria dos pesticidas em água é baixa, em parte devido ao fato de serem geralmente pouco solúveis e em parte, devido ao efeito da diluição. Isto, no entanto, não exclui a possibilidade de que concentrações muito altas venham a ocorrer após pesadas chuvas, especialmente quando áreas ao redor de um corpo d'água tenham sido recentemente tratadas com altas doses de pesticidas (MONTEIRO, 2006). De acordo com DORES & FREIRE (2001), mesmo em concentrações baixas, os pesticidas apresentam riscos para espécies de organismos aquáticos. Não existe nível seguro previsível para pesticidas na água,

pois a ocorrência do processo de biomagnificação pode aumentar consideravelmente os efeitos tóxicos nos organismos.

### 1.2 Metil-Paration



**Figura 1 - Estrutura química do Metil-Paration.**

O Metil-Paration (figura 1) (MP) é um dos inseticidas organofosforado utilizados em larga escala em diversos países, comercialmente conhecido como Dalf, Dymethyl Parathion, Devithion, E 601, Folidol-M, Fosferno M50, Kilex Parathion, Metaphos, Metron, Metacide, Nitrox 80, Parton M, Penncap-M, entre outras definições (EXTOXNET, 1999). No mercado brasileiro, o produto é comercializado como Folidol 600 (fabricante Bayer) e Folisuper 600 Br (fabricante Agripec) (MONTEIRO, 2006).

O pesticida é classificado pela EPA (Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) como Pesticida de Uso Restrito, pertencente à classe toxicológica dos compostos extremamente tóxicos, podendo ser utilizado somente por aplicadores autorizados (EPA, 1999).

MACHADO & FANTA (2003) afirmam que no Brasil, o MP é muito utilizado para controle de uma grande variedade de insetos em varias culturas, tais como algodão, milho, soja, cana de açúcar e cítricos, entre outros, sendo muito utilizado no estado do Paraná contra o inseto “broca” (*Eutinobothrus brasiliensis*). Como consequência do uso indiscriminado de pesticidas, os alimentos comercializados em diversas metrópoles brasileiras como São Paulo, Rio de Janeiro, Distrito Federal, Belo Horizonte e outras, mostraram-se contaminados com agrotóxicos em

concentrações acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira (CALDAS & SOUZA, 2000).

Além disso, em sistemas de cultivo de peixes, o MP é comumente utilizado na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixes, com objetivo de eliminar predadores aquáticos como larva de inseto (SILVA *et al.*, 1993).

Deste modo, os peixes podem estar constantemente sujeitos à exposição ao MP, seja acidental ou em condições de tratamento em tanques de criação, sendo de grande importância o estudo dos seus efeitos em espécies nativas (MONTEIRO, 2006).

### **1.3 Brânquias**

Em peixes, as brânquias, assim como a pele, são os primeiros tecidos a serem atingidos em casos de poluição aquática, pois, exibem uma ampla superfície que se encontra em contato direto e permanente com potenciais agentes tóxicos diluídos na água, sendo o principal órgão atingido por contaminação hídrica (BERNET *et al.*, 1999).

Entretanto, tanto as brânquias como a pele possuem células produtoras de muco, o que aumenta a proteção primária contra patógenos e substâncias tóxicas, e podem funcionar como uma barreira à absorção de agentes químicos diluídos na água. As brânquias são responsáveis por variadas funções nos peixes, tais como, trocas gasosas, osmorregulação, excreção de produtos nitrogenados e balanço ácido-base, portanto, se este órgão for comprometido, a saúde do organismo estará em risco (CENGIZ & UNLU, 2005). A presença de poluentes no ambiente aquático pode interferir na funcionalidade do tecido branquial causando alterações na via respiratória e no equilíbrio iônico dos peixes (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2000). Por isso as brânquias funcionam como tecido alvo e podem ser utilizadas como modelo para estudos de impacto ambiental. As mudanças morfológicas, consequência da mudança ambiental, é uma tentativa do indivíduo para conservar algumas funções fisiológicas (MACHADO & FANTA, 2003).

Alterações morfológicas podem ser regressivas ou progressivas. As alterações regressivas são um processo que termina na redução funcional ou perda

do órgão, como a alteração da estrutura e arquitetura da célula. As alterações progressivas são mudanças que levam a um aumento da atividade das células ou tecidos, como a hipertrofia que é o aumento do volume celular sem crescer o número de células e a hiperplasia, que aumenta o tecido ou órgão pelo aumento do número de células, sem aumentar seu volume (BERNET, 1999).

As alterações são divididas em importância patológica de acordo com sua reversibilidade, as alterações de fator 1 consideradas como alterações patológicas mínimas, sendo facilmente reversíveis. As alterações de fator 2, são consideradas patologias moderadas, podendo vir a ser reversível caso o estressor seja neutralizado. As alterações de fator 3 são as alterações de patologia importante, sendo geralmente irreversível, levando a perda parcial ou total da função do órgão (BERNET, 1999).

#### ***1.4 Acetilcolinesterase (AChE)***

A acetilcolinesterase é a enzima presente na maioria das sinapses químicas. A enzima acetilcolinesterase está sempre presente e é responsável pela hidrólise e, portanto, remoção do neurotransmissor. À medida que diminui a quantidade de substâncias transmissora, o potencial pós-sináptico geralmente diminui (SCHMIDT-NIELSEN, 1996).

De acordo com STENESH (1998), na transmissão sináptica é essencial que a acetilcolina seja degradada rapidamente, antes da chegada de um novo impulso nervoso. A AChE catalisa a hidrólise da acetilcolina, que é então transformada em colina e acetato, com a liberação de um próton. A hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico e muscarínico da membrana pós-sináptica permitindo sua abertura, a entrada de íons  $\text{Na}^+$  e a despolarização da membrana, o que irá propagar o potencial de ação subsequente (RABITTO, 2003).

Na AChE existe um centro ativo para inativação da Acetilcolina. A inibição da acetilcolinesterase por organofosforado dá-se através da sua ligação com o sítio específico da enzima, diferindo apenas o tipo de ligação. Tais substâncias são posteriormente hidrolisadas e a enzima se regenerada (GUILOSKI, 2009). A taxa de regeneração varia de acordo com o composto. O que ocorre é que a inibição da

enzima acetilcolinesterase pelos organofosforado é feita inicialmente por uma ligação iônica, mas a enzima é progressivamente fosforilada por uma ligação covalente, processo que normalmente leva 24 a 48 horas para ocorrer. Tal fenômeno denomina-se "*envelhecimento*" da enzima e quando ocorre, está não mais se regenera (GUILOSKI, 2009). Sendo assim, os pesticidas organofosforados são considerados inibidores irreversíveis da AChE.

Efeitos resultantes da inibição da AChE podem ocorrer no sistema nervoso central ou periférico, autônomo ou somático (STURM *et al.*, 1999).

### **1.4 Biomarcadores**

Biomarcadores são alterações biológicas que expressam a exposição e o efeito tóxico de poluentes presentes no ambiente (WALKER *et al.* 1996). O uso do termo biomarcador é restrito a mudanças celulares, bioquímicas, molecular, fisiológica, fluidos corporais, tecidos e órgãos no organismo (LAM & GRAY, 2003)

De acordo com OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* (2005), o uso de biomarcadores na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas de impacto vem sendo amplamente utilizado nas últimas décadas. O monitoramento dos efeitos biológicos tem sido recentemente um componente integral dos programas de monitoramento ambiental incrementando os métodos mais comumente usados. Durante anos, muitos biomarcadores têm sido muito eficientes em provar com antecedência os efeitos deletérios nos sistemas biológicos estimando os efeitos causados pelos contaminantes (SILVA, 2007).

Uma mudança na abordagem dos problemas ecológicos, que antes visavam reparar danos e/ou restaurarem a vida, hoje visa proteger e preservar o ecossistema. Nessa óptica de preservação, e por estarem relacionados às respostas primárias das células aos impactos recebidos do meio, os biomarcadores são vistos como instrumentos eficientes de prevenção e de avaliação de riscos ecológicos (MONTEIRO, 2006).

## **2. Objetivos**

### ***2.1 Objetivo Geral***

Avaliar os efeitos do Metil-Paration em brânquias e músculo de peixes *Astyanax altiparanae* (Lambari) empregando microscopia eletrônica de varredura e análise enzimática da Acetilcolinesterase.

### ***2.2 Objetivo Específico***

- Investigar possíveis alterações morfológicas em brânquias sob microscopia eletrônica de varredura.
- Quantificar a atividade enzimática da Acetilcolinesterase, através do músculo.
- Avaliar o uso potencial das ferramentas empregadas na avaliação do efeito de poluentes em peixes.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Animais

Foi utilizado neste projeto peixes da espécie *Astyanax altiparanae* (figura 2), uma espécie tropical, endêmica da região sul do Brasil. Esta espécie se encontra distribuída pela bacia do alto rio Tibagi e bacia do alto rio Iguaçu (DOMINGUES, 2005).

*Astyanax altiparanae* caracteriza-se por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada, a região dorsal é cinzenta e no flanco a faixa lateral prateada raramente é visível. As nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas, enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. A mancha umeral característica é azul cobalto, apresentando variação de tonalidades conforme o ângulo de incidência da luz. As duas barras verticais e a mancha do pedúnculo caudal são cinzas ou acinzentadas, sendo que a última apresenta reflexos azulados, também conforme incidência da luz. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI & BRITSKI, 2000).

Os animais pertencem ao gênero *Astyanax*, família Characidae, subfamília Tetragonopterinae e ordem Characiformes.

Esta espécie foi selecionada como modelo experimental por estar sendo amplamente utilizada nos estudos toxicológicos desenvolvidos pelo Grupo AQUATOXI.



Figura 2 - *Astyanax altiparanae* (Lambari)

### ***3.2 Desenho Experimental***

Foram utilizados 63 peixes no presente estudo. Sendo 21 para o grupo controle, 21 para os indivíduos expostos a concentração de 0,25 ppm de Metil-Paration e mais 21 para o grupo de concentração de 0,5 ppm de Metil-Paration. Essa dose foi escolhida devido a concentração de mortalidade em estudos prévios.

Os animais foram coletados em estações de piscicultura de Araucária (PR) e mantidos no laboratório por um mínimo de 20 dias antes do início do estudo, para ajustes às condições de laboratório. Após o período de aclimatização, foram colocados em aquários de 12 (doze) litros por 07 (sete) dias com o poluente Metil-Paration dissolvido em água. Um grupo controle foi mantido nas mesmas condições exceto pela presença do contaminante. A exposição foi estática, onde a água foi mantida até o final do experimento para não interferir nos parâmetros comportamentais.

Para o desenvolvimento dos experimentos o fotoperíodo foi controlado para 12h de luz e 12h escuro, sendo as 12h de claridade das 7:00 às 19:00 h, por meio de temporizador. Os animais foram alimentados com ração padronizada na proporção de 3% da biomassa, dividida em 2 vezes ao dia. A primeira fração foi ofertada 1 hora após o início do período de luz e, a segunda, 1 hora antes do início do período escuro.

Após o período de exposição, os animais foram anestesiados até óbito com Benzocaína, 80 g/L. para então proceder coleta a coleta do material.

Foram coletadas 10 brânquias de cada grupo para análise de microscopia eletrônica de varredura e 21 amostras músculos de cada grupo para análise enzimática da Acetilcolinesterase.

### ***3.3 Microscopia eletrônica de varredura de brânquias***

O conjunto das brânquias foram removidos, lavados e fixados com glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2 – 7,4) por 2 horas, desidratadas em série crescente de etanol (MERCK®).

O ponto crítico ocorreu em CO<sub>2</sub> líquido e a metalização com ouro, ambos no Centro de Microscopia Eletrônica. As brânquias então foram analisadas no

microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, também no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Foram analisadas 29 brânquias, sendo 10 do grupo controle, 09 do grupo contaminado 0,25 ppm e 10 do contaminado 0,5 ppm. As brânquias foram percorridas no aumento de 100x do microscópio eletrônico de varredura, sendo elas observadas em toda a sua extensão.

No presente trabalho as alterações foram classificadas de acordo com BERNET (1999). Foram encontradas alterações de fator 1, hipertrofia e alterações estruturais, como desarranjo lamelar e perda de digitações. De fator 2, hiperplasia e de fator 3, fusão parcial e fusão total, como mostrados na tabela 1, onde são observadas também a frequência com que cada alteração ocorreu nas brânquias.

### ***3.4 Análise da atividade da Acetilcolinesterase***

Uma amostra de músculo foi obtida fazendo-se uma incisão próxima a linha lateral na altura da nadadeira dorsal de aproximadamente 2 x 2 cm, colocados em eppendorfs e imediatamente congelados a – 20°C.

O músculo, após ser descongelado, foi pesado e homogeneizado na proporção de 1:10 em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5, utilizando o homogeneizador Potter-Elvehjem. Os homogeneizados foram transferidos a *eppendorfs* de 2ml e centrifugados por 20 min a 4°C a 10.000 g. Os sobrenadantes foram estocados em novos eppendorfs e congelados a -20°C para análise posterior e o macerado descartado.

As amostras de sobrenadante foram diluídas (1:10 ou 10% V/V) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5. Após a diluição cada amostra foi agitada e pipetada em 4 réplicas de 50 µl na microplaca de leitura em espectrofotômetro, seguido de 200 µl de DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato), cujo princípio é o desenvolvimento da reação colorida que ocorre entre o DTNB e a tiocolina, que é o resultado da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca TECAN A-5082 com comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram expressos em nmol.min<sup>-1</sup>.mgproteína<sup>-1</sup>.

Para a quantificação da proteína nas amostras foi utilizado o método de BRADFORD (1976), com curva padrão de soro de albumina bovina.

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism por ANOVA de uma via para determinar se havia diferença entre os grupos, seguida do Teste de Turkey's para demonstrar qual grupo diferia do controle, com  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ .

## 4. Resultados

### *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em brânquias*

No grupo controle houve maior incidência de hiperplasia, 80% (figura 3 D), porém essa alteração ocorria em uma frequência pequena nas brânquias, houve também algumas fusões parciais, em pouca frequência (tabela 2). As brânquias apresentavam aparência normal, com as lamelas primárias e secundárias sem alterações e alinhadas (figura 3 A e B). As microdigações eram visíveis e tinham a forma normal (figura 3 C).

No grupo exposto a 0,25 ppm de MP houve incidência de hiperplasia, como no grupo controle, porém a frequência foi maior. Houve também hipertrofia (figura 4 C e D) em 88% das brânquias também em uma alta frequência. 88% das brânquias também apresentaram fusão parcial, sendo elas nas diversas frequências. Apenas 11% das brânquias apresentaram fusão total das lamelas, em baixa frequência (tabela 3). As microdigações começaram a apresentar mudanças, mostrando alterações no seu padrão (figura 4 A). Começou a aparecer uma fragilidade do tecido (figura 4 B).

No grupo exposto a 0,5 ppm de MP houve incidência de hiperplasia, em 50% dos indivíduos em alta frequência. Hipertrofia (figura 5 D e E) ocorreu em 80% das brânquias, também em alta frequência, assim como o grupo contaminado 0,25 ppm. Neste grupo, a ocorrência de fusão parcial (figura 5 C) também teve 90% das brânquias analisadas, sendo a maioria delas em alta frequência. 40% das brânquias apresentaram fusão completa (figura 5 F), mesmo em baixa frequência (tabela 4). As microdigações sofreram alteração, perdendo totalmente o padrão das mesmas (figura 5 A). Neste grupo também ocorreu a fragilidade do tecido (figura 5 B).

Tabela 1- Frequência das alterações encontradas nas brânquias do grupo controle e dos grupos expostos a 0,25 ppm e 0,5 ppm de Metil-Paration após 7 dias.

<b>Alteração (fator de importância)</b>	<b>Frequência (% na brânquia)</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>0,25 ppm</b>	<b>0,5 ppm</b>
<b>Hipertrofia (fator 1)</b>	< 25	0	11%	0
	25 - 50	0	0	20%
	50 - 75	0	0	0
	> 75	0	77%	60%
<b>Hiperplasia (fator 2)</b>	< 25	60%	11%	0
	25 - 50	0	0	0
	50 - 75	20%	0	0
	> 75	0	44%	50%
<b>Fusão parcial (fator 3)</b>	< 25	30%	33%	20%
	25 - 50	0	22%	30%
	50 - 75	10%	22%	0
	> 75	0	11%	40%
<b>Fusão total (fator 3)</b>	< 25	0	11%	30%
	25 - 50	0	0	10%
	50 - 75	0	0	0
	> 75	0	0	0

Tabela 2 - Ocorrência das alterações nos indivíduos do grupo controle.

Alteração	Controle									
	Indiv .01	Indiv .02	Indiv .03	Indiv .04	Indiv .05	Indiv .06	Indiv .07	Indiv. 08	Indiv .09	Indiv .10
<b>Hipertrofia</b>	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
<b>Hiperplasia</b>	< 25	n/o	< 25	< 25	< 25	50 - 75	n/o	50 - 75	< 25	< 25
<b>Fusão parcial</b>	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	50 - 75	< 25	< 25	< 25	n/o
<b>Fusão total</b>	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o

Nota: Ocorrência expressa em % da superfície total da brânquia. N/O = não ocorreu.

Tabela 3 - Ocorrência das alterações nos indivíduos do grupo contaminado a 0,25 ppm com Metil-Paration, após 7 dias de exposição.

Alteração	0,25 ppm								
	Indiv .01	Indiv .02	Indiv .03	Indiv .04	Indiv .05	Indiv .06	Indiv .07	Indiv .08	Indi v.09
<b>Hipertrofia</b>	> 75	> 75	< 25	> 75	< 25	> 75	> 75	n/o	> 75
<b>Hiperplasia</b>	n/o	n/o	n/o	> 75	< 25	> 75	> 75	> 75	n/o
<b>Fusão parcial</b>	> 75	25 - 50	25 - 50	n/o	< 25	< 25	50 - 75	50 - 75	< 25
<b>Fusão total</b>	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	< 25	n/o

Nota: Ocorrência expressa em % da superfície total da brânquia. N/O = não ocorreu.

Tabela 4 - Ocorrência das alterações nos indivíduos do grupo contaminado a 0,5 ppm com Metil-Paration, após 7 dias de exposição.

Alteração	0,5 ppm									
	Indiv .01	Indiv .02	Indiv .03	Indiv .04	Indiv .05	Indiv .06	Indiv .07	Indiv .08	Indiv .09	Indiv .10
<b>Hipertrofia</b>	> 75	25 - 50	25 - 50	n/o	> 75	n/o	> 75	> 75	> 75	> 75
<b>Hiperplasia</b>	n/o	n/o	> 75	> 75	n/o	> 75	n/o	n/o	> 75	> 75
<b>Fusão parcial</b>	> 75	25 - 50	25 - 50	> 75	< 25	> 75	n/o	25 - 50	> 75	< 25
<b>Fusão total</b>	< 25	n/o	n/o	25 - 50	n/o	< 25	n/o	n/o	< 25	n/o

Nota: Ocorrência expressa em % da superfície total da brânquia. N/O = não ocorreu.

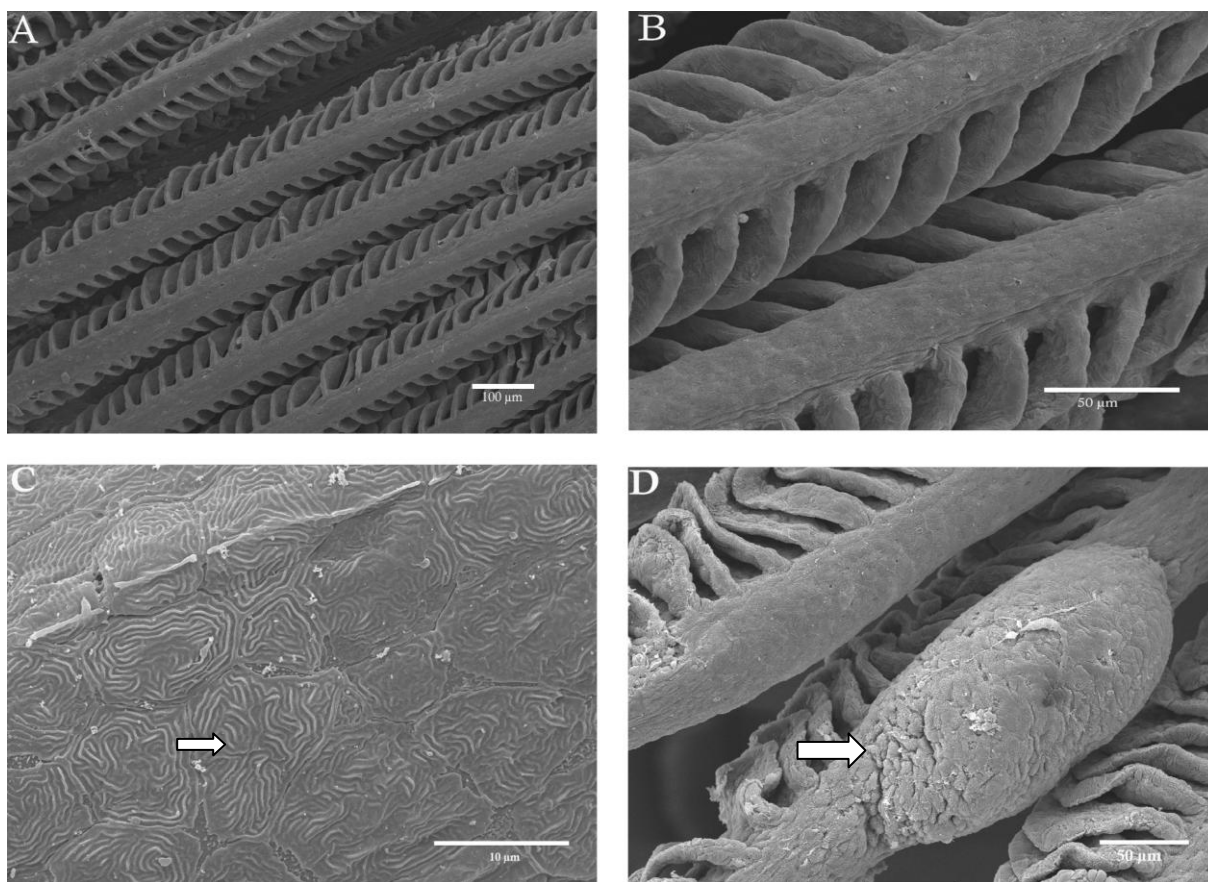


Figura 3 – Brânquias de *Astyanax altiparanae*. Grupo controle. A: aparência de uma brânquia normal, sem alterações nas lamelas primárias e secundárias. Em B é observado um detalhe das lamelas primárias e secundárias. C: microdigitações normais. D: hiperplasia na lamela primária.

FONTE: O AUTOR, 2009.

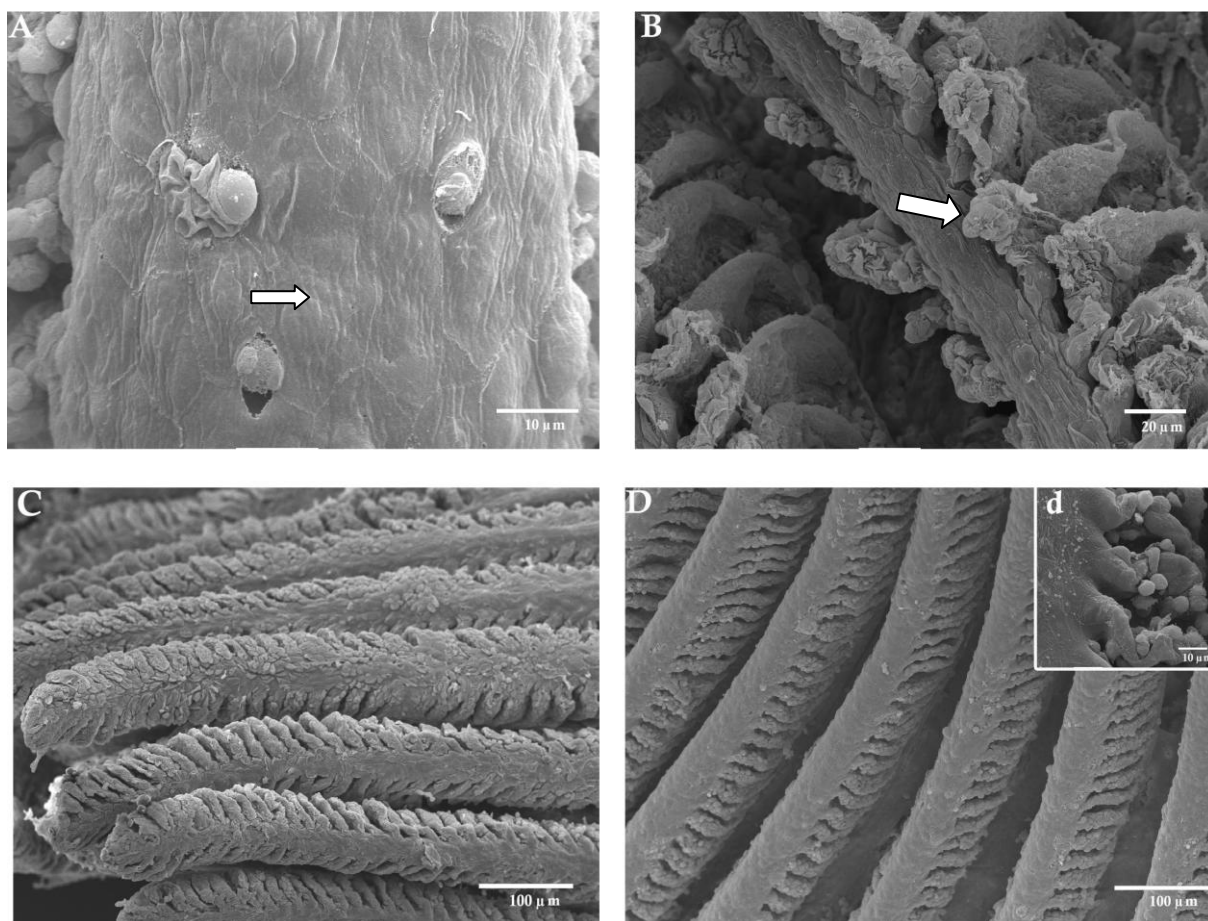


Figura 4 – Brânquias de *Astyanax altiparanae* exposto a 0,25 ppm de Metil-Paration, após 7 dias de exposição. A: perda das microdigitações. B: descamação do epitélio da lamela secundária, devido a fragilidade do tecido. C e D: hipertrofia nas lamelas secundárias; d: detalhe da lamela secundária, mostrando a expansão do volume celular.

FONTE: O AUTOR, 2009.

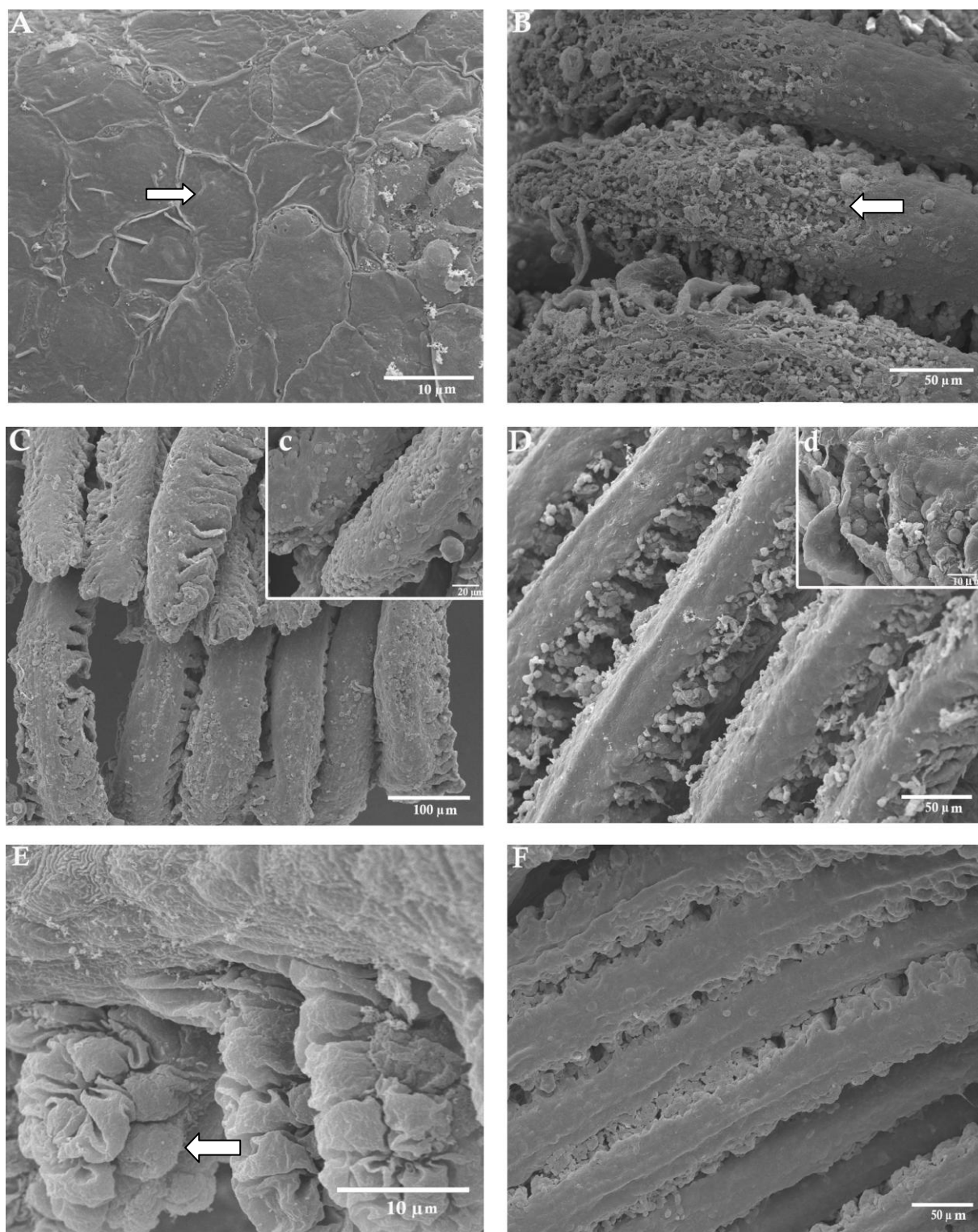


Figura 5 – Brânquias de *Astyanax altiparanae* exposto a 0,5 ppm de Metil-Paration, após 7 dias de exposição. A: perda das microdigitações. B: descamação do epitélio da lamela primária, devido a fragilidade do tecido. C: fusão parcial e total das lamelas D: hipertrofia nas lamelas secundárias; d: detalhe da lamela secundária, mostrando a expansão do volume celular. E: detalhe da hipertrofia celular mostrando

a expansão do volume das células epiteliais da lamela secundária. F: fusão total das lamelas.

FONTE: O AUTOR, 2009.

### **Atividade da AChE em músculo axial de *Astyanax altiparanae***

Houve uma inibição significativa da atividade da Acetilcolinesterase no grupo exposto a 0,25 ppm e 0,5 ppm de Metil-Paration quando comparados com o grupo controle. Este dado mostra uma inibição dose dependente, sendo que os dois grupos se diferenciam em entre si (figura 6).

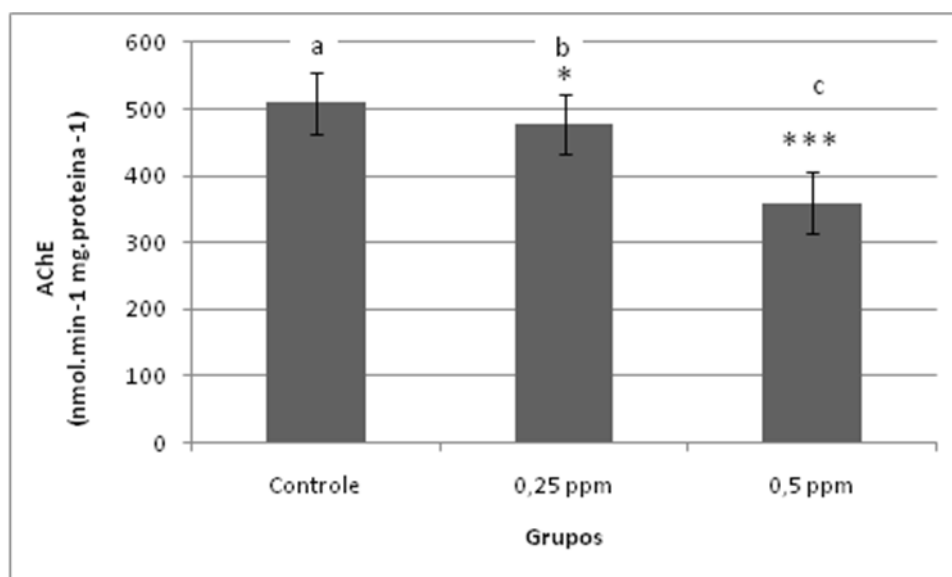


Figura 6 – Atividade da acetilcolinesterase muscular em *Astyanax altiparanae* expostos ao Metil-Paration por 7 dias. As barras expressam a média da atividade da acetilcolinesterase muscular  $\pm$  erro padrão. \* = diferença significativa  $p < 0,05$ ; \*\*\* = diferença significativa  $p < 0,001$ . Letras diferentes significam grupos diferentes estatisticamente.

## 5. Discussão

A utilização de brânquias na microscopia eletrônica de varredura e a análise da atividade da Acetilcolinesterase em músculo foram escolhidas como bioindicadores nesse trabalho por constituírem ferramentas já padronizadas para a espécie em estudo.

Embora não tenha sido documentado, observou-se que as brânquias dos animais expostos ao contaminante apresentaram uma alta quantidade de muco, o que sugere um primeiro mecanismo de defesa contra um agente químico.

No presente trabalho foi encontrado as seguintes alterações morfológicas: hiperplasia, hipertrofia, fusão parcial, fusão total e alteração estrutural das microdigitações.

Foi observada hiperplasia celular no grupo controle, que se manteve nos grupos afetados pelo pesticida, podendo ser uma alteração já existente nos indivíduos coletados em Araucária. Este dado nos leva a suspeitar da qualidade da água destes ambientes.

No entanto a hipertrofia tecidual, aumento do volume celular e tecidual aumentando o número de células (BERNET, 1999), foi encontrada apenas nos grupos contaminados, tanto a 0,25 ppm quanto a 0,5 ppm de Metil-Paration, sugerindo uma resposta fisiológica e morfológica ao xenobionte, podendo essa alteração ser reversível (BERNET, 1999). No entanto a exposição contínua pode favorecer um dano mais grave não avaliado neste trabalho.

Essas alterações, hiperplasia e hipertrofia podem se manter, evoluindo-se para o quadro de fusão das lamelas. Essa fusão pode ser parcial, quando apenas algumas lamelas secundárias se fundem ou uma fusão total, quando todas as lamelas secundárias se fundem, o que diminui a área de superfície da brânquia, comprometendo as trocas gasosas.

No presente trabalho foi observado uma grande quantidade de fusão parcial nos grupos contaminados tanto à 0,25 ppm quanto à 0,5 ppm de Metil-Paration. Esse tipo de lesão é considerado irreversível de acordo com BERNET (1999).

Além da fusão parcial, também foi observada fusão completa, porém, apenas no grupo contaminado com 0,5 ppm de pesticida, indicando que o poluente pode comprometer as trocas gasosas, podendo interferir com a osmorregulação, a excreção de produtos nitrogenados e o balanço ácido-base.

As microdigitações, estruturas comumente encontradas na superfície das lamelas primárias dos peixes (EIRAS-STOFELLA *et al*, 2001), foram afetadas nos grupos contaminados com 0,25 ppm e 0,5 ppm de Metil-Paration, perdendo seu padrão de distribuição, chegando a desaparecer em alguns exemplares. MACHADO & FANTA (2003) demonstraram em experimentos com *Metynnus roosevelti*, que sobre a ação da concentração subletal de 1 ppm de Metil-Paration, uma alteração progressiva foi observada na forma das microdigitações, que chegaram a desaparecer em algumas células depois de 96h de exposição. Pode-se observar que mesmo em concentrações menores de contaminantes, estes já fazem um efeito morfológico nas brânquias, atrapalhando sua função fisiológica, diminuindo a oxigenação do tecido, gerando uma barreira entre as trocas gasosas (MALLATT, 1985).

Outra alteração encontrada nas brânquias dos indivíduos contaminados foi a descamação do epitélio, tanto da lamela primária, quanto da lamela secundária. Sendo que no grupo contaminado com 0,5 ppm de pesticida, essa descamação do epitélio ocorreu mais intensamente.

Uma hipótese aos eventos de descamação é a ação do poluente sobre o tecido epitelial, levando a perda de aderência entre as células o que aumentaria a fragilidade do tecido. Dessa forma, no momento de lavagem do material e/ou fixação para análise de microscopia eletrônica de varredura, essas células poderiam se soltar. Esta hipótese é reforçada pelo aspecto normal do restante do tecido.

De acordo com BEREITER-HAHN *et al.* (1979) e SHARMA *et al.* (2005), as microdigitações são formadas por filamentos de actina. A provável ação do pesticida Metil-Paration no citoesqueleto da célula pode ser sugerida devido a perda das microdigitações nos grupos contaminados com 0,25 ppm e 0,5 ppm e pela fragilidade do tecido, devido a perda de adesão entre as células, levando ao descolamento do epitélio durante o manuseio do material. Essa perda de adesão

entre as células pode ser um dos efeitos do pesticida sobre os filamentos de actina e outros componentes do citoesqueleto.

Em áreas contaminadas, a exposição de organismos a xenobiontes indica interações entre essas substâncias químicas e os sistemas biológicos, sendo que estas podem resultar em distúrbios bioquímicos e/ou respostas adaptativas dos organismos expostos (MASFARAUD, 1992). A contaminação de ecossistemas aquáticos pode causar conseqüências drásticas para o ecossistema, podendo levar os indivíduos à morte imediata, provocar alterações agudas ou como conseqüência da exposição crônica danos permanentes que dependendo do grau de interação podem resultar na morte do organismo ou prejudicá-lo em suas funções fisiológicas normais (FRANÇA, 2005).

O presente estudo demonstra que tantos aspectos bioquímicos quanto morfológicos corroboram a necessidade de uma investigação mais significativa dos efeitos dos poluentes nos ambientes naturais. Desta forma, aspectos fisiológicos em peixes podem estar sob efeito de um grande número de fatores químicos, biológicos e físicos. Os agentes químicos estressores subletais podem provocar mudanças significativas a longo prazo, acarretando prejuízos no crescimento, desempenho reprodutivo ou na resistência a doenças. Como resultado, o sucesso reprodutivo pode ser comprometido, diminuindo a sobrevivência dos indivíduos, com conseqüências para a população e a comunidade envolvida (JOBBLING, 1995).

As brânquias por estarem em contato direto com o meio aquático e conseqüentemente com os poluentes, possuem respostas morfológicas como conseqüência de mudanças ambientais, como uma tentativa adaptativa em conservar algumas funções fisiológicas (LAURENT & PERRY, 1991).

Os dados do presente trabalho corroboram a importância da utilização destas estruturas na avaliação aguda do efeito de poluentes presentes na água.

Sabe-se que diversos fatores, tais como pesticidas organofosforados (MALLATT, 1985; EVANS, 1987; LAURENT & PERRY, 1991; MACHADO & FANTA, 2003; MONTEIRO 2006; GUILOSKI 2009), ácidos (KAWALL, 1993), lixo industrial (LINDESJÖÖ & THULIN, 1994), derivados de petróleo (KATSUMITI, 2006; SILVA, 2009) e metais pesados (OLIVEIRA RIBEIRO, 2005; SILVA, 2007), podem mudar o

epitélio branquial e alterar funções fisiológicas, prejudicando a função normal do órgão.

Em relação à atividade enzimática da Acetilcolinesterase em músculo, os resultados encontrados nesse trabalho mostram que a atividade da enzima teve uma diminuição significativa tanto no grupo contaminado com 0,25 ppm de Metil-Paration, quanto no 0,5 ppm, sendo a inibição da atividade da AChE diferente nos dois grupos. A acetilcolinesterase teve uma inibição de 6,35% do grupo 0,25 ppm em relação ao grupo controle e de 29,33% do grupo 0,5 ppm para o controle.

Esses resultados corroboram com os estudos que afirmam que organofosforados diminuem a atividade da enzima acetilcolinesterase (AGUIAR, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007), sendo a AChE um bom biomarcador extremamente usado em estudos ecotoxicológicos (KIRBY *et al.*, 2000).

GUILOSKI (2009) mostrou que *Corydoras sp.* expostos a Metil-Paration por 96h em concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg. L<sup>-1</sup> de poluente tiveram a atividade da enzima acetilcolinesterase inibida consideravelmente, tanto em músculo quanto em cérebro, sendo que em todas as concentrações, a inibição foi acima de 90%.

ALMEIDA *et al.* (2005) demonstrou também que a atividade da acetilcolinesterase tanto em músculo quanto em cérebro de *Brycon cephalus* foi inibida após 24h de exposição a 2 ppm de Metil-Paration. Nesse trabalho, houve uma inibição de 64% no músculo e 69% em cérebro, ambas significativas em relação ao controle. Após 8 dias de recuperação, a atividade da AChE no cérebro continuava baixa, apesar de ser observado uma pequena tendência a recuperação, o que não ocorreu em músculo, que a atividade da enzima continuava inibida, mesmo depois dos 8 dias de recuperação.

De acordo com PERKINS & SCHLENK (2000) a inibição da Acetilcolinesterase é o fator mais importante na mortalidade de peixes, a perda do controle muscular pode causar vários problemas para o indivíduo, incluindo perda do controle de natação e parada do movimento opercular.

Alguns dados citogenéticos foram considerados neste mesmo trabalho e mostraram os animais expostos ao Metil-Paration sofreram danos no DNA. Esses resultados foram observados em teste de micronúcleo písceo e teste de Ensaio

Cometa, onde os grupos expostos a 0,25 ppm e 0,5 ppm de MP demonstraram que este organofosforado pode apresentar um efeito genotóxico para a espécie (GHISI *et al.*, 2009 a b).

As análises por microscopia eletrônica de varredura foram importantes para determinar os efeitos do pesticida Metil-Paration nas brânquias, podendo a metodologia ser usada como biomarcador. O uso da acetilcolinesterase demonstrou ser bastante eficiente na análise neurotóxica dos peixes, sendo uma técnica importante para avaliação dos efeitos poluentes sob a biota.

## 6. Conclusões

As avaliações morfológicas de brânquias e a avaliação neurotóxica através da atividade da Acetilcolinesterase mostraram o potencial tóxico do pesticida Metil-Paration para indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae*.

O uso de biomarcadores facilita a interpretação dos efeitos de xenobióticos em organismos aquáticos.

Apesar dos efeitos observados mostrarem eventos conclusivos, ainda há necessidade de outros estudos utilizando outros tipos de biomarcadores.

## 7. Referências

- ABOU-ARAB, A.A.K.; AYESH, A. M.; AMRA, H. A. **Characteristic levels of some pesticides and heavy metals in important fish.** Food Chem., V.57, p. 487-492, 1996.
- AGUIAR, L. H.; MORAES, G.; AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; CORRÊA, C. F. **Metabolical effects of Folidol 600® on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*.** Environmental Reserch. V.95, p.224-230, 2004.
- ALBANIS, T. A.; HELA, D. G.; SAKELLARIDES, T. M.; KONSTANTNOU, I. K. **Monitoring of pesticides residues and their metabolites in surface and underground waters of Imathia (N. Greece) by means of solid-phase extraction disks and gas chromatography.** J. Chromatog. V. 823A, p. 59-71, 1998.
- ALMEIDA, L. C.; AGUIAR, L. H.; MORAES, M. **Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*).** Ciência Rural, Santa Maria. V.35, n.6, p.1412-1416, 2005.
- ALTOE, A.; MARANHÃO, M.; ZANIN, M. **Agrotóxicos, a realidade do Paraná.** Paraná: Secretaria do Meio Ambiente, p. 92, 1992.
- BEREITER-HAHN, J.; OSBORN, M.; WEBWER, K.; VÖTH, M. **Filament organization and formation of microridges at the surface of fish epidermis.** J. Ultrastructure. Research. V.69, p.316-330, 1979.
- BERNET, D.; SCHIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. **Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution.** Journal of Fish Diseases. V.22, p.25-34, 1999.
- BRADFORD, M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analitical Bioquemistry. V 72, p.248-254, 1976.
- CALDAS, E.D. & SOUZA, L.C.K.R. **Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira.** Rev. Saúde Pub., V.34, p. 529-537, 2000.
- CENGIZ, E.I. & UNLU, E. **Sublethal effects of commercial deltametrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study.** Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005.
- DOMINGUES, M. S. **Citogenética comparativa de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000) do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu.** Dissertação de mestrado na área de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005
- DORES, E.F.G.C. & FREIRE, E.M.L. **Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em**

**Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar.** Quím. Nova, V. 24, p. 27-36, 2001.

EIRAS-STOFELLA, D. R.; CHARVET-ALMEIDA, P.; FANTA, E.; VIANNA, A. C. C. **Surface ultrastructure of the gills of the mullets *Mugil curema*, *M. liza* and *M. platanus* (Mugilidae, Pisces).** Journ. Morphol. V.247, p.122-133, 2001.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Office of Pesticide Programs Health Effects Division. Washington, 1999.

EVANS, D. H. **The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants.** Env. Health Perspective. V.71, p.47-58, 1987.

EXTOXNET – **Extension Toxicology Network** – Methyl Paration. Disponível em [<http://extoxnet.orst.edu/pips/methylpa.htm>]. Acesso em: 04 agosto 2009.

FRANÇA, P. P. **Uso de biomarcadores na avaliação do impacto do acidente do navio vicuña / 2004 na baía de Paranaguá – PR: análises preliminares.** Dissertação de graduação no departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GARUTTI, V. & BRITSKI, H. A. **Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia.** Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS Série Zoologia. V.13, p.65-88, 2000.

GHISI, N. C.; BATISTA, L.; ARAUJO, M. L. P.; OLIVEIRA RIBEIRO C. A.; CASTILHO, M.; SILVA de ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M. **Efeito genotóxico do metil-paration em *Astyanax altiparanae*,** . Ann IV Simpósio Brasil-Alemanha/ 4. Deutsch-Brasilianisches Symposium, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 2009 a.

GHISI, N. C.; BATISTA, L.; ARAUJO, M. L. P.; OLIVEIRA RIBEIRO C. A.; CASTILHO, M.; SILVA de ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M. **Efeito genotóxico agudo do metil-paration em *Astyanax altiparanae*, testado pelo ensaio cometa.** Ann. XIII Simpósio de Citogenética e Genética de Peixes, “Biodiversidade, Variabilidade e Aplicações”. Ponta Grossa, Paraná, Brasil. 2009 b.

GUILOSKI, C. I. **Estudos *in vivo* e *in vitro* dos efeitos de pesticidas em peixes nativos.** Dissertação de mestrado na área de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes.** Chapman & Hall, London, 1995

KATSUMITI, A.K. **Uso de biomarcadores de contaminação ambiental na avaliação do impacto do vazamento de óleo derivado de petróleo em ecossistemas de água doce.** Dissertação de mestrado na área de Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

KAWALL, H. G. **Efeito de águas ácidas em *Gymnocorymbus ternetzy* (Boulenger, 1895) (Pisces: Characidae)**. Dissertação de mestrado na área de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1993.

KIRBY, M.F. **The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries**. Marine Pollution Bulletin. V.40, n.9, p.780-791, 2000.

LAM, P. K. S. & GRAY, J. S. **The use of biomarkers in environmental monitoring programmes**. Marine Pollution Bulletin. 46: 182-186. 2003

LAURENT, P. & PERRY, S. F. **Environmental effects on fish gill morphology**. Phisical Zoology. V.64 (1), p.4-25, 1991.

LINDESJÖÖ, E. & THULIN, J. **Histopathology of skin and gills of fish in pulp mill effluents**. Dis. Aquat. Org. V.18, p.81-93, 1994.

MACHADO, M.R. & FANTA, E. **Effects of organophosphorus methyl parathion on branchial epithelium of freshwater fish *Metynnis roosevelti***. Braz. Arch. Biol. Technol. V.46, p. 361-372, 2003.

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

MASFARAUD, J. F. **DNA adduct formation and 7-ethoxyresorufin O-deethylase induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to benzo[a]pyrene**. Toxicology in vitro. V.6, p.1715-1733, 1992.

MONTEIRO, D.A. **Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folisuper 600 Br) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta**. Dissertação de mestrado na área de Fisiologia, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2006.

MOREIRA, J.C. et al. **Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, Rio de Janeiro**. Ciênc. Saúde Colet. V. 7, p. 299-311, 2002.

OLIVEIRA, M. M.; SILVA FILHO, M. V.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; FERNANDES, F. C; CUNHA BASTOS, J. **Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes**. Marine Environmental Reserch. V.63, p.303-312, 2007.

OLIVEIRA RIBEIRO C.A.; VOLLAIRE Y.; SANCHEZ-CHARDI A.; ROCHE H. **Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla Anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France**. Aquatic. Toxicology V.74, p.53-69, 2005.

PERKINS, E. J. & SCHLENK, D. **In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: Role of biotransformation in acute toxicity.** Toxicological Sciences. V.53, p.308-315, 2000.

PLANQUETE, P. ; KEITH, P. ; LE BAIL, P.Y. **Atlas des poissons d'eau douce de Guyane (tome 1).** Collection du Patrimoine Naturel, vol.22. IEGB-Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, INRA, CSP, Min. Env., Paris. 429,1996.

RABITTO, I. S. **Análise dos efeitos tóxicos do TBT (Tributilestanho) e Chumbo inorgânico (Pb++) em *Hoplias malabaricus* (Block, 1974) (Traíra) após exposição trófica e subcrônica: aspectos morfológicos e neurotóxicos.** Dissertação de mestrado na área de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2003.

RISSATO, S.R. ; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. **Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP).** Quím. Nova, V. 27, p. 739-743, 2004.

SHARMA, A.; ANDERSON, K. I.; MÜLLER, D. J. **Actin microridges characterized by laser scanning confocal and atomic force microscopy.** FEBS Letters. V.759, p.2001-2008, 2005.

SILVA, C. A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; KATSUMITI, A.; ARAUJO, M. L. P.; ZANDONÁ, E. M.; COSTA SILVA, G. P.; MASCHIO, J.; ROCHE, H.; SILVA de ASSIS, H. C. **Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil.** Ecotoxicology and Environmental Safety. V.72, p.400-409, 2009.

SILVA, G. S. **Avaliação dos efeitos da exposição crônica ao mercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) coletados na usina hidrelétrica de Samuel – Rondônia.** Dissertação de mestrado na área de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2007

SILVA, H. C.; MEDINA, H. G. S.; FANTA, E.; BACILA, M. **Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei).** Comp. Biochem. Physiol., V. 105C, p. 197-201, 1993.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente.** São Paulo, Santos, Ed. 5, 1996.

STURM, A.; SILVA ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. **Cholinesterase of marine teleost fish: enzymological characterization and potencial use in monitoring of neurotoxic contamination.** Nat. Environ. Res., V.47, p. 1-10, 1999.

VAN DEN HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J.; MACKINNON, M.; DIXON, D. G. **Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters.** Ecological and Environment Safety, v.46. p. 334-341, 2000.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY R.M.; PEAKALL D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis. Londres, 321p., 1996.