

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - SETOR PALOTINA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

RONALDO DE OLIVEIRA GREGORIO

**LESÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS TECIDOS SANGUÍNEO, HEPÁTICO E
BRANQUIAL DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) CULTIVADOS EM
ÁREAS SUSCETÍVEIS À CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS**

PALOTINA

2017

RONALDO DE OLIVEIRA GREGORIO

**LESÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS TECIDOS SANGUÍNEO, HEPÁTICO E
BRANQUIAL DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) CULTIVADOS EM
ÁREAS SUSCETÍVEIS À CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável do Setor Palotina, Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. Área de concentração: Impactos ambientais da atividade de Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Almir Manoel Cunico

Coorientador: Prof. Dr. Milton Ronnau

PALOTINA

2017

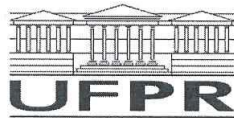
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G821 Gregorio, Ronaldo de Oliveira
Lesões histopatológicas dos tecidos sanguíneos, hepáticos e branquial de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivados em áreas suscetíveis à contaminação por pesticidas / Ronaldo de Oliveira Gregorio. -- Palotina, 2017
34f.

Orientador: Almir Manoel Cunico
Coorientador: Milton Ronnau
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

1. Lesão celular. 2. Defensivos agrícolas. 3. Micromúcleos.
4. Hepatopatia. I. Cunico, Almir Manoel. II. Ronnau, Milton.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 639.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós-Graduação AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RONALDO DE OLIVEIRA GREGORIO** intitulada: **Lesões histopatológicas dos tecidos sanguíneo, hepático e branquial de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivados em áreas suscetíveis à contaminação por pesticidas**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 31 de Julho de 2017.

ALMIR MANOEL CUNICO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ALINE DE MARCO VIOTT
Avaliador Externo (UFPR)

ANDRÉ MARTINS VAZ DOS SANTOS
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo que tem feito em minha vida, principalmente as conquistas e por ter me concedido paciência.

Aos meus pais José de Gregorio e Isaura Oliveira de Gregorio (*in memoriam*), por sempre estar me apoiando nas minhas caminhadas. E meu irmão Ricardo de Oliveira Gregorio que admiro muito e por sempre estar do meu lado pra tudo.

À minha filha, pelos momentos que um simples sorriso, todo o estresse sumia, e por ser quem mais me faz feliz.

À Eliane Pereira de Loiola, que me deu meu maior presente e pela parceria.

Ao meu orientador Professor Dr. Almir Manoel Cunico, pela paciência, pelos aprendizados. Muito Obrigado

Ao meu Co-orientador Professor Dr. Milton Ronnau pelas trocas de experiência.

Ao Professor Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester pelo suporte para a realização da minha pesquisa.

Ao Professor Dr. Leandro Portz pelas conversas de apoio.

Aos meus Amigos Thiago Augusto da Silva, Petra Ewald, Natali Miiller, Rafaela, Antônio Muniz, Isaac Brasil por toda a ajuda (inclusive em momentos difíceis/pessoal) e disponibilidade ao longo do mestrado. Sem vocês não teria conseguido chegar até aqui!

Aos meus amigos Marcelo dos Santos, Rafael Margatto, Ana Paula Oliveira e Laressa Caciano, Ataize por me suportarem nos dias mais turbulentos e sempre estarem de prontidão pro abraço!!!

Aos colegas do LEPI, pelos momentos que passamos juntos e dividimos nossas experiências.

Aos piscicultores que disponibilizaram as propriedades para a realização da pesquisa.

Aos professores, técnicos (em especial ao Pedro), motoristas da Universidade Federal do Paraná.

Ao grupo da CAPES, para o esclarecimento de muitas dúvidas e as piadas descontraídas.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”
— Cora Coralina

RESUMO

A contaminação por resíduos de pesticidas em tanques de cultivo de peixes, decorrentes da lixiviação de áreas agrícolas, pode produzir respostas histopatológicas adversas nesses organismos. O objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência de alterações em células sanguíneas, brânquias e fígado de indivíduos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivados em tanques de piscicultura suscetíveis a contaminação por pesticidas. O material biológico foi retirado de 100 indivíduos de tilápia do Nilo oriundos de cinco pisciculturas, sendo 20 indivíduos por propriedade. As propriedades foram escolhidas pela proximidade de áreas agrícolas e potencial de contaminação por pesticidas. As análises citológicas das células sanguíneas indicaram presença de micronúcleos nos eritrócitos. As alterações branquiais observadas foram: hiperplasia entre lamelas, espessamento lamelar, deslocamento de epitélio, dilatação capilar (aneurisma), edema, fusão lamelar, proliferação epitelial e atrofia lamelar. Dentre as lesões hepáticas destacaram-se ocorrência de núcleos periféricos nos hepatócitos, vacuolização, desarranjo cordonal, necrose tecidual, presença de melanomacrófagos, degeneração nuclear e núcleo picnótico. As alterações encontradas nos tecidos de *O. niloticus* podem ser consideradas indicadores biológicos de contaminação aquática por pesticidas na produção de peixes em cativeiro.

Palavras-chave: Lesão celular. Defensivos agrícolas. Micronúcleos. Hepatopatia. Branquite. Aquicultura.

ABSTRACT

Contamination by pesticide residues in fish culture tanks resulting from the leaching of agricultural areas may produce adverse histopathological responses in these organisms. The objective of this work was to analyze the occurrence of alterations in blood cells, gills and liver of individuals of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) grown in pisculture tanks susceptible to contamination by pesticides. The biological material was collected from 100 individuals of Nile tilapia from five fish farms, of which 20 were individuals. The properties were chosen because of the proximity of agricultural areas and potential for contamination by pesticides. Cytological analysis of blood cells indicated the presence of micronuclei in erythrocytes. Gill alterations were observed: lamellar hyperplasia, lamellar thickening, epithelial displacement, capillary dilation (aneurysm), edema, lamellar fusion, epithelial proliferation and lamellar atrophy. Among the liver lesions were peripheral nuclei in the hepatocytes, vacuolization, cordonal derangement, tissue necrosis, presence of melanomacrophages, nuclear degeneration and pycnotic nucleus. The alterations found in *O. niloticus* tissues can be considered biological indicators of aquatic contamination by pesticides in the production of captive fish.

Key words: Cell injury. Pesticides. Micronuclei. Hepatopathy. Branquite. Aquaculture.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS	11
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2 METODOLOGIA	11
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	11
2.2 AMOSTRAGEM DE DADOS.....	13
2.2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA.....	13
2.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO	14
2.3 ANÁLISE DE DADOS.....	16
3 RESULTADOS	16
3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA.....	16
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO	17
3.2.1 HEMÁCIAS.....	18
3.2.2 BRÂNQUIAS	19
3.2.3 FÍGADO.....	22
4 DISCUSSÃO	25
5 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O uso inadequado do solo e a intensa utilização de pesticidas visando aumento da produtividade agrícola representa uma importante fonte de contaminação das águas superficiais e subterrâneas na atualidade (SHIOGIRI et al., 2012). No Brasil tal fato torna-se ainda mais evidente, principalmente por assumir a posição de maior consumidor de pesticidas do mundo (TAVELLA et. al., 2011), ultrapassando em 2014 a marca de 1 milhão de toneladas, o que representa um consumo *per capita* médio de 5,2 Kg/ano (INCA, 2015).

Segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (2012), dentro do território nacional o Estado com maior índice consumidor de pesticidas é o Mato Grosso, representando 18,9%, seguido pelos estados de São Paulo (14,5%), e Paraná com 14,3%. O volume total de pesticidas comercializados no Estado do Paraná foi de 158.481.566 kg no ano de 2013 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016), com maior concentração de uso nos núcleos regionais de Cornélio Procópio, Guarapuava, Laranjeiras do Sul, Ivaiporã, Irati e Toledo, apresentando valores entre 7,0 e 11,8 kg/ha/ano (IPARDES, 2010).

Dentre os principais pesticidas utilizados pela agricultura destacam-se os herbicidas, empregados fundamentalmente no controle de plantas daninhas em monoculturas extensivas como o milho e a soja (IBAMA, 2010). O plantio e subsequente aplicação dos pesticidas nas culturas, associados à ocorrência de chuvas, faz com que aumente a probabilidade de contaminação dos ambientes aquáticos, uma vez que são facilmente carregados com o movimento das águas, pela percolação no solo, transportando resíduos para águas subterrâneas ou por escoamento superficial que favorece a contaminação das águas superficiais, especialmente em regiões com extensas áreas de cultivo (MARCHESAN et al., 2010; GAMA et al., 2013; DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014). Tais fatos tornam-se mais conspícuos em locais com elevada declividade do terreno e limite de plantio próximos a ambientes aquáticos (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014).

Essas características tornam os tanques escavados utilizados pela aquicultura, pontos de recebimento de águas lixiviadas das plantações adjacentes, já que são estabelecidos nas porções mais baixas dos terrenos, devido à necessidade de estar próximos a rios e riachos para o abastecimento de água, sendo

potencialmente suscetíveis a inserção de resíduos de pesticidas, e promovendo a contaminação das espécies produzidas por estes sistemas de cultivo (BELO et al., 2012).

Dentre as espécies mais cultivadas na piscicultura destaca-se a tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus, 1758), um peixe de grande interesse mundial (LIMA, 2011). Na aquicultura brasileira a cadeia produtiva da tilápia desponta como a mais importante (OLIVEIRA, 2009) por adequar-se as condições climáticas do país e possuir um pacote tecnológico otimizado para a produção (SIDONIO et al., 2012). Além destas características, as tilápias são produzidas em larga escala em sistemas intensivos, por ser extremamente tolerantes a condições ambientais adversas, tais como, variações de pH, oxigênio dissolvido, amônia, temperatura e salinidade, além de grande tolerância ao manejo e a doenças (YASUI et al., 2006). Organismos que apresentam tais padrões, podem ser usados como bioindicadores de qualidade da água, principalmente por contaminação de pesticidas, uma vez que em contato com esses pesticidas, podem produzir alterações celulares e teciduais como resposta aos contaminantes (CASTRO et al., 2014).

Nas células sanguíneas, a presença de micronúcleos nos eritrócitos destacam-se como alterações estruturais decorrentes do contato com pesticidas durante o processo de divisão celular, produzindo fragmentos nucleares (BÜCKER et al., 2006; BOTELHO, 2013). Nas brânquias, pesticidas presentes no ambiente aquático afetam e induzem o aparecimento de lesões pela exposição direta, interferindo na fisiologia respiratória do organismo (CANTANHÊDE et al., 2014; VIRGENS; CASTRO; CRUZ, 2015) e no fígado, alterações histopatológicas hepáticas são severas e frequentes, e mesmo em baixas concentrações de pesticidas, o metabolismo energético celular pode ser danificado, dificultando o desempenho do órgão em realizar suas funções (SCHWAIGER et al., 1997; SALVO et al., 2015).

Neste contexto, o estudo e identificação de alterações histopatológicas destaca-se como importante ferramenta para detecção da potencial contaminação dos organismos aquáticos produzidos em sistemas de cultivo aquícola e expostos a contaminação potencial por pesticidas. Logo, nossa hipótese é que resíduos de pesticidas provenientes de áreas agrícolas podem contaminar sistemas de produção aquícola adjacentes, promovendo alterações morfofisiológicas em tecidos branquiais, hepáticos e células sanguíneas da espécie de cultivo *O. niloticus*.

1.1 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a ocorrência de alterações histopatológicas em indivíduos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes da contaminação por pesticidas em tanques de piscicultura.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar características físicas e químicas da água dos tanques amostrados determinando possível contaminação pelo pesticida glifosato.
- Identificar alterações morfofisiológicas em lamelas branquiais provocadas pela exposição a pesticidas.
- Identificar alterações histológicas no tecido hepático ocasionadas pelos compostos residuais de pesticidas.
- Identificar alterações histológicas em micronúcleos de hemácias pela exposição aos compostos residuais de pesticidas.

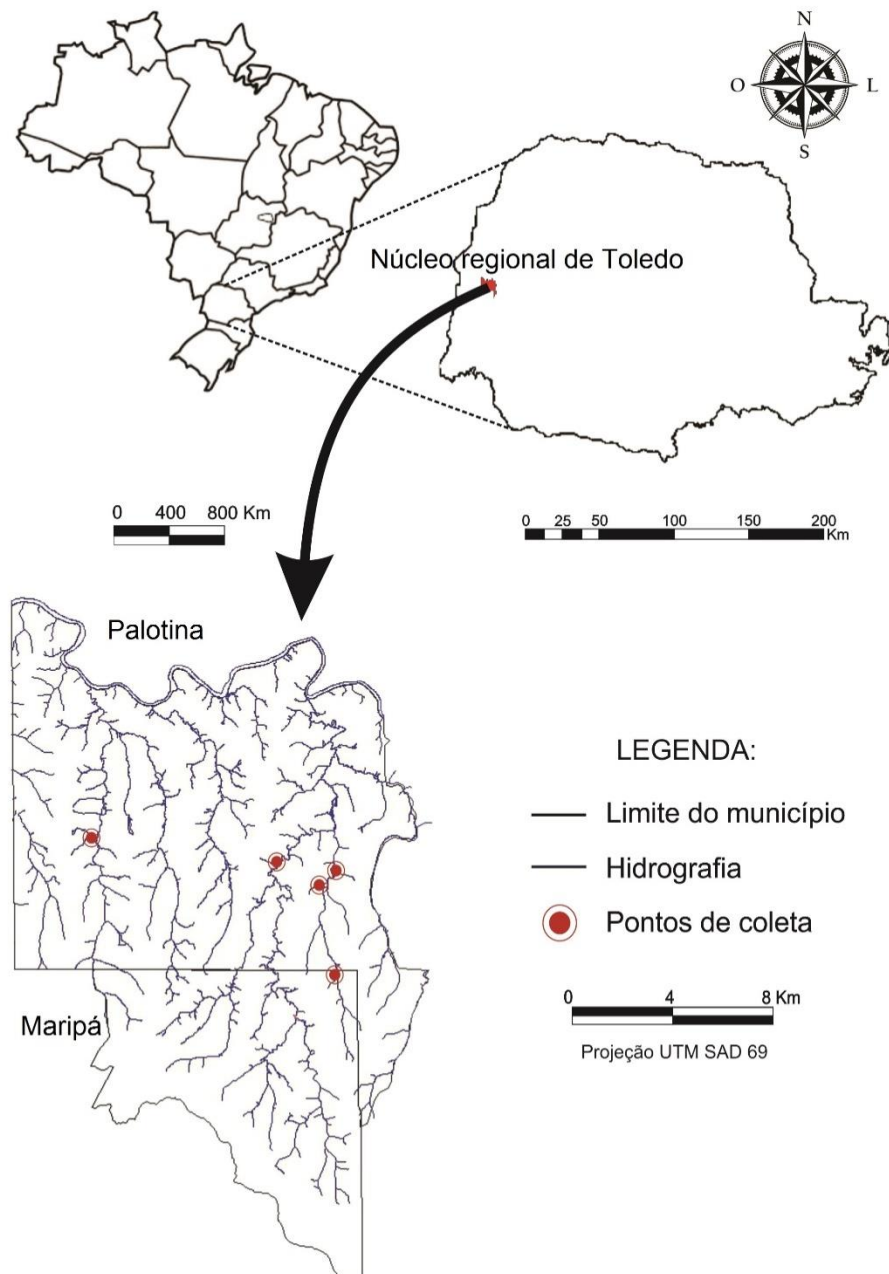
2 METODOLOGIA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na região Oeste do estado do Paraná, a qual apresenta uma área total de 22.851 km², equivalente a 11,45 % da área total do estado e uma população de 1.230.266 habitantes (JEBAI; MOREJON, 2015). Caracterizada pela intensa atividade agropecuária, destaca-se como a mesorregião paranaense com áreas de grande uso de pesticidas, sendo a região de Toledo, a maior em produção agropecuária, destacando-se a produção de grãos, avicultura, suinocultura e piscicultura (RODRIGUES; RIPPEL, 2013).

O estudo foi realizado em quatro pisciculturas localizadas no município de Palotina e uma no município de Maripá (FIGURA 1), as quais utilizam sistema de produção em tanques escavados, com características fisiográficas semelhantes e estabelecidas adjacentes a áreas com intensa atividade agrícola (TABELA 1).

FIGURA 1. MAPA DE IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA, DISTRIBUÍDOS NAS MICROBACIAS DOS RIOS AZUL E SÃO CAMILO.



FONTE: João Gabriel Bordignon Gomes (2017).

TABELA 1. PERFIL DAS PROPRIEDADES COLETADAS, QUANTO AS CARACTERÍSTICAS DOS TANQUES, DENSIDADE, MICROBACIA E O RESPECTIVO USO E OCUPAÇÃO DO SOLO (AGRICULTURA).

LOCAL	LAMINA D'ÁGUA (TANQUE - m ³)	DENSIDADE (PEIXE/m ³)	MICROBACIA	USO E OCUPAÇÃO DO SOLO (AGRICULTURA) DA MICROBACIA (ZACARKIM; OLIVEIRA, 2015)
Prop. A	6000	6 à 7	Rio São Camilo	≈80%
Prop. B	9000	7	Rio Azul	≈85%
Prop. C	10000	5 à 6	Rio Azul	≈85%
Prop. D	6000	5	Rio Azul	≈85%
Prop. E	8000	8 à 9	Rio Azul	≈85%

Fonte: O autor (2017).

2.2 AMOSTRAGEM DE DADOS

As coletas do material biológico foram realizadas no mês de fevereiro de 2016 em cinco pisciculturas durante o período de despesca, ao final do ciclo de produção aquícola. Em cada piscicultura um tanque foi selecionado aleatoriamente e coletado amostras de água e fragmentos de brânquias, fígado e tecido sanguíneo para as análises histopatológicas e citológicas. Os critérios de seleção das pisciculturas foram a proximidade de áreas de intensa atividade agrícola, com relevo declive, tanques escavados e na região mais baixa da propriedade.

As propriedades apresentavam locais limpos, com boa aeração, formulação das rações fornecidas semelhantes e livre de umidade durante o período de armazenamento.

2.2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA

Parâmetros limnológicos como Ph (pHmetro da marca HANNA HI-9125), oxigênio dissolvido em mg/L (oxímetro portátil LUTRON DO-5519) e temperatura da água (°C) foram mensurados antes do início da coleta de material biológico, com a finalidade de comparar com os valores de referência para o cultivo de tilápia. Posteriormente amostras de água foram coletadas para determinação de resíduos do pesticida Glifosato, sendo estabelecidas de acordo com a NBR 9898 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1987). As amostras foram coletadas em tréplica e homogeneizadas para formar uma única amostra, sendo armazenadas em

frascos de 2 L de polietileno e acondicionadas em caixa térmica com gelo. As coletas foram feitas mensalmente iniciando em setembro/2016 e finalizando em janeiro/2017. O período foi escolhido por coincidir com a época de maior aplicação de pesticidas a base de Glifosato (GLY), no ciclo produtivo da soja.

Para a detecção do composto GLY e seu derivado ácido aminometilfosfônico (AMPA), foi usada a técnica de HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com o equipamento cromatógrafo líquido, marca *Thermo Scientific*, modelo *Ultimate 3000*, composto por módulo de bomba, auto injetor e detector *Dionex Ultimate 3000*. A metodologia de determinação dos compostos foi baseada em Peruzzo et al. (2008), com adaptação e otimização por Peiter (2017).

2.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram amostrados de cada tanque selecionado, 20 indivíduos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) saudáveis em inspeção visual e em homogeneidade de tamanho. De cada indivíduo coletado foi extraído amostras de sangue, fígado e brânquias, utilizando somente a porção mediana da segunda brânquia do arco branquial direito para análises histopatológicas, respeitando o protocolo de procedimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPR – Palotina (Registro CEUA 01/2016).

As amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca, mediante o uso de seringas de 3 mL com agulhas hipodérmicas previamente embebidas em solução de EDTA (3%). O sangue foi acondicionado em eppendorf com 0,5 µL da solução de EDTA, em seguida em caixa térmica com gelo. Foi preparado esfregaços em número de cinco lâminas por animal e expostos à secagem em temperatura ambiente. Após a secagem, os esfregaços foram fixados em metanol durante 5 minutos e corados com GIEMSA, diluída na proporção de 2 gotas da solução para cada ml de água destilada, por um período de 10 minutos, após o procedimento as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas em temperatura ambiente (CAPUTO et al., 2010).

Para a coleta, preparação e confecção das lâminas de fígado e brânquias, os procedimentos e protocolos histológicos foram de acordo com a metodologia proposta por Ross e Pawlina (2011) e Caputo et al. (2010), para os tecidos a fixação usada foi a solução de ALFAC, emblocamento em parafina, e submetidos a coloração de rotina

para H-E (hematoxilina-eosina). Posteriormente, as lâminas foram visualizadas em microscopia óptica. A frequência de micronúcleos foi determinada em eritrócitos da circulação periférica, de acordo com a metodologia proposta por Schmid (1975) e modificada para o uso em peixes, observando-se os critérios propostos por Titenko-Holland et al. (1997).

Foram considerados válidos para efeitos de genotoxinas, apenas os casos com ocorrência de micronúcleos em, no mínimo, três células a cada 1000 analisadas; estruturas refringentes não foram consideradas micronúcleos, como proposto por Schmid (1975). A coloração do micronúcleo foi idêntica à do núcleo, e apenas eritrócitos individualizados, com formato oval e citoplasma intacto, foram contados, evitando-se os sobrepostos ou que apresentavam dobras. Considerou-se micronúcleos estruturas menores ou iguais a um terço do núcleo e claramente separados. Micronúcleos alterados, foram analisados sob microscopia óptica comum, em resolução de 10 X 100, sob imersão. Quanto as análises de brânquias e fígado, as alterações foram comparadas com alterações por pesticidas já descritas na literatura (DEVI e MISHRA, 2013; SOUSA, D. B.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N., 2013; SILVA et al., 2014; STOYANOVA et al., 2015; ULLAH et al., 2015; MAISANO et al., 2016; MURUSSI et al., 2016; YANCHEVA et al., 2016).

A classificação das lesões encontradas nos cortes histológicos de brânquias e fígados quanto a intensidade e distribuição (TABELAS 2 e 3), foram realizadas de acordo com o diagnóstico proposto pelo AFIP (*Armed Forces Institute of Pathology*):

TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE INTENSIDADE DAS LESÕES ENCONTRADAS NOS TECIDOS HISTOLÓGICOS DE BRÂNQUIAS E FÍGADOS.

INTENSIDADE	DESCRIÇÃO
Discreta	Menos que 5% de alteração no tecido
Leve	5 à 30% de alteração no tecido
Moderada	30 à 70% de alteração no tecido
Acentuada	70 à 95% de alteração no tecido
Severa	95 à 100% de alteração no tecido

FONTE: O autor (2017)

TABELA 3. CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE DISTRIBUIÇÃO DAS LESÕES ENCONTRADAS NOS TECIDOS HISTOLÓGICOS DE BRÂNQUIAS E FÍGADOS.

DISTRIBUIÇÃO	DESCRIÇÃO
Focal	Lesões presentes em uma única região do corte histológico
Multifocal	Lesões presentes em vários pontos do corte histológico
Difusa	Lesões presentes em todo o corte histológico

FONTE: O autor (2017)

2.3 ANÁLISE DE DADOS

As frequências de alterações nas lamelas branquiais, tecido hepático e nas hemácias foram testadas em relação às cinco propriedades amostradas (teste G, H_0 : as frequências de alterações é independente das propriedades). Na sequência, as frequências de alterações de cada propriedade foram somadas e testadas em relação às suas proporções em cada categoria (teste qui-quadrado de aderência) (ZAR, 2010).

Estes mesmos procedimentos analíticos também foram aplicados para avaliar as alterações em micronúcleos das hemácias (frequência de indivíduos com e sem alterações), as alterações morfofisiológicas nas brânquias (oito categorias) e no fígado (sete categorias). Em todos os testes estatísticos adotou-se $\alpha = 0,05$ (ZAR, 2010).

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA

Durante o estudo, foi observado pequena variação dos parâmetros limnológicos mensurados, com exceção a variável oxigênio dissolvido nas propriedades A e B (TABELA 4), entretanto os valores estão dentro dos limites de referência para a produção de *O. niloticus* (SHELTON; POPMA, 2006).

TABELA 4. PARÂMETROS LIMNOLÓGICOS ANALISADOS NAS PROPRIEDADES AMOSTRADAS EM REGIÕES SUSCEPTÍVEIS A CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS.

LOCAL	O.D. (mg/L)	TEMP. ÁGUA	
		(°C)	pH
Prop. A	8,1	26,7	8,19
Prop. B	2,6	27,4	8,48
Prop. C	4,2	25,1	7,93
Prop. D	5,2	26,4	7,89
Prop. E	4,4	27,1	8,21

Prop. = Propriedade; O.D. = Oxigênio dissolvido; Temp. = Temperatura.

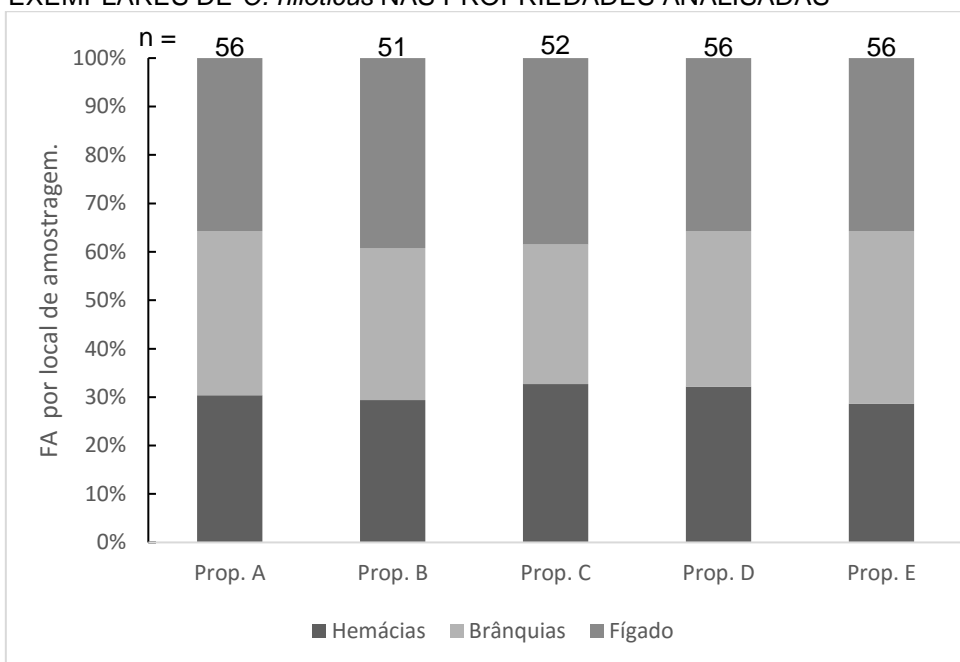
FONTE: O autor (2017)

No que condiz a análise química da água para a detecção de glifosato e seu metabolito AMPA nos tanques de cultivo, as concentrações ficaram abaixo do limite de detecção da metodologia proposta (10,0 µg L⁻¹), sendo portanto inconclusivas (PEITER, 2017).

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Em todas as propriedades amostradas os exemplares de *O. niloticus* apresentaram alterações branquiais, hepáticas e sanguíneas (FIGURA 2), com padrão de ocorrência e frequência semelhante ($G_w = 0,8579$; $p = 0,9991$). No total, apesar das diferentes frequências de alterações (37% de hepáticas, 32% de branquiais e 31% de sanguíneas), esta variação não foi significativa ($X^2 = 1,69$; $p = 0,43$).

FIGURA 2. PROPORÇÕES DE ALTERAÇÕES BIOLÓGICAS NOS EXEMPLARES DE *O. niloticus* NAS PROPRIEDADES ANALISADAS

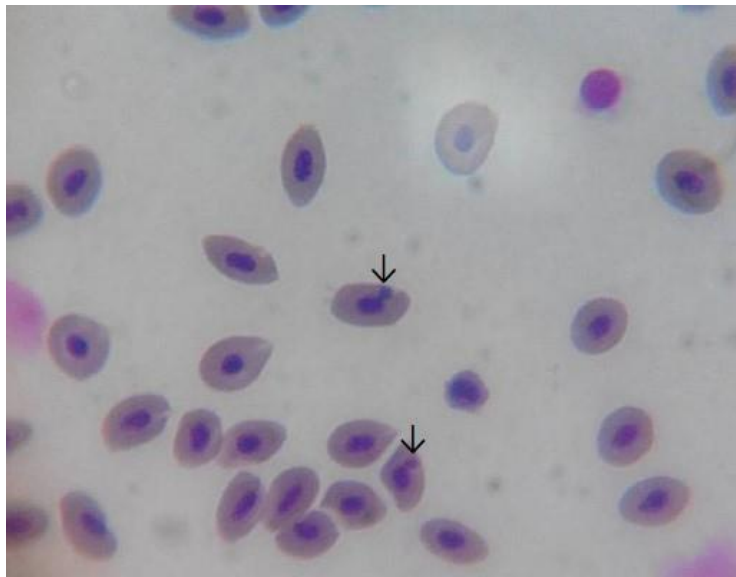


FONTE: O autor (2017)

3.2.1 HEMÁCIAS

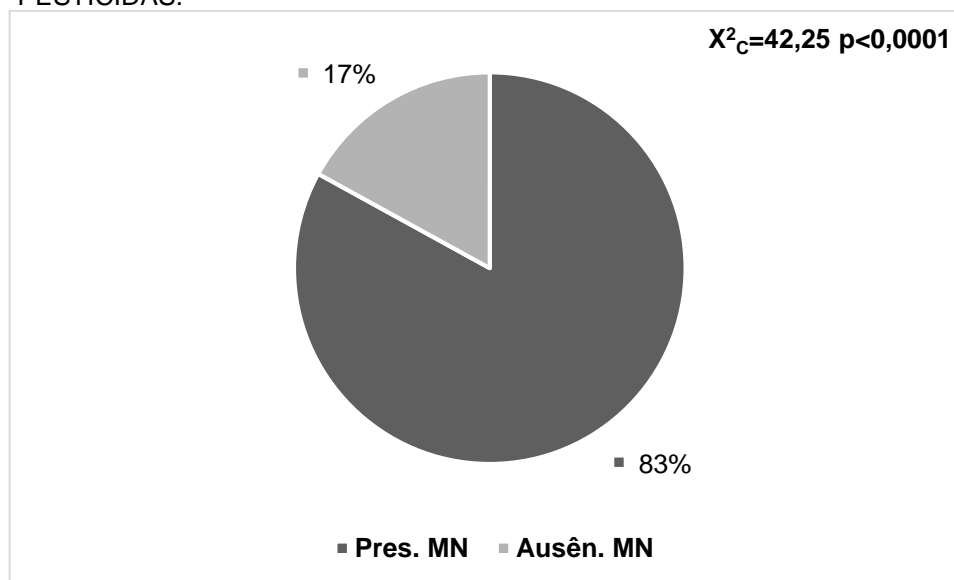
As células sanguíneas apresentaram micronúcleos periféricos (FIGURA 3) em todas as cinco propriedades, indistintamente ($G_w = 1,74$; $p = 0,783$). No total, houve prevalência de indivíduos (83%) com presença de micronúcleos nas células ($X^2 = 42,25$; $p < 0,0001$) (FIGURA 4), além de apresentarem anomalias nucleares estruturais na morfologia de núcleos principais, com diferentes graus de evaginação e irregularidade na membrana nuclear.

FIGURA 3. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM ERITRÓCITOS DE *O. niloticus* EM ÁREAS SUSCEPTÍVEIS A CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS. PRESENÇA DE MICRONÚCLEOS (SETA) EM REGIÃO PERIFÉRICA DAS CÉLULAS. MICROSCOPIA ÓPTICA – 40X – HE.



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 4. PRESENÇA E AUSÊNCIA DE MICRONÚCLEO EM ERITRÓCITOS DE *O. niloticus* EM ÁREAS SUSCEPTÍVEIS A CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS.



FONTE: O autor (2017)

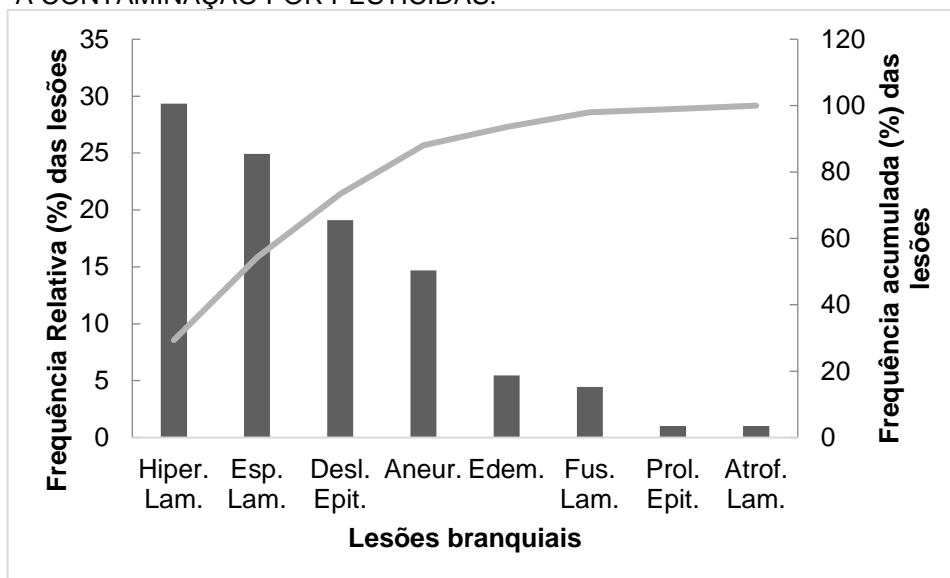
3.2.2 BRÂNQUIAS

Análises macroscópicas e microscópicas não mostraram presença de parasitas, e danos mecânicos. Quanto ao aspecto macroscópico das brânquias, mostravam saudáveis com coloração vermelho vivo.

Os resultados do exame histopatológico indicaram oito tipos de alterações, cuja frequência de ocorrência não variou entre as cinco propriedades analisadas ($G_w = 377,26$; $p = 0,104$). No total, a frequência de ocorrência dos diferentes tipos de alterações observadas foram significativamente distintas ($X^2 = 202,64$; $p < 0,0001$), ocorrendo em 86% dos indivíduos amostrados hiperplasia entre lamelas, em 73% espessamento lamelar e em 56% deslocamento de epitélio, estas três lesões são subagudas, representando juntas mais de 70% de todas as alterações histopatológicas detectadas nas brânquias dos indivíduos analisados (FIGURA 5). Destaca-se ainda uma lesão crônica como a vasodilatação (aneurisma) com uma ocorrência em 43% das amostras. Lesões menos representativas como edema (16%), fusão lamelar (13%), proliferação epitelial (3%) e atrofia lamelar (3%) (FIGURA 5), também foram observadas e provavelmente oriundas de respostas secundárias de caráter crônico, quando em contato agentes estressores.

As alterações apresentaram graus diferentes de intensidade e distribuição nas brânquias analisadas. A hiperplasia entre lamelas, apresentou alterações leves, moderadas e acentuadas em áreas multifocais e difusa, com infiltração de células de defesa no espaço intersticial (FIGURA 6, C). O espessamento lamelar apresentou alterações leves em áreas multifocais e moderadas em áreas multifocais e difusas, a lesão ocorreu pelo aumento do espaço capilar e aumento do volume sanguíneo, evidenciado pelo número de eritrócitos presentes no espaço (FIGURA 6, B). Deslocamento de epitélio, distribuídos em áreas multifocais com alterações leves e moderadas, e em área difusa com alterações moderadas a acentuadas, essa lesão aumenta a distância entre o meio e a lamela, dificultando as trocas de gases, com intuito de evitar o contato das lamelas à compostos prejudiciais aos organismos (FIGURA 6, A).

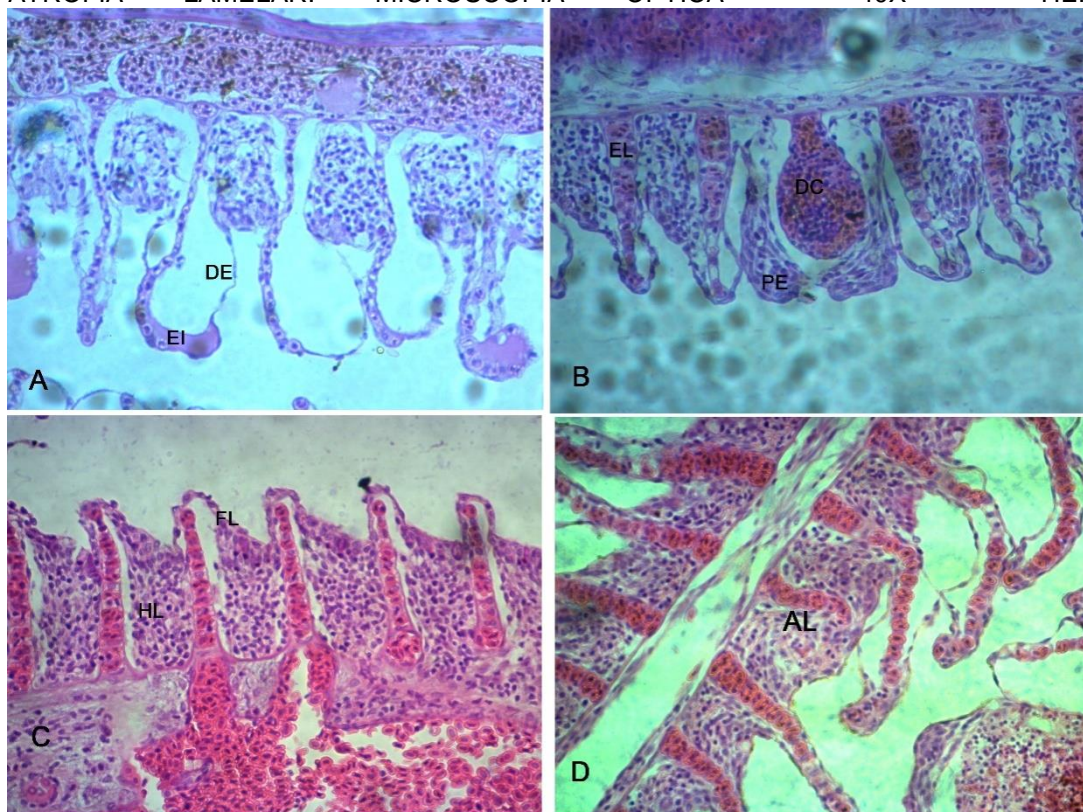
FIGURA 5. FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ENCONTRADAS EM BRÂNQUIAS DE *O. niloticus* EM ÁREAS SUSCEPTÍVEIS A CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS.



FONTE: O autor (2017).

Provavelmente, a evolução do espessamento lamelar, devido ao aumento do espaço capilar, seja responsável pela vasodilatação (aneurisma) nas lamelas secundárias (FIGURA 6, B). Ocorreu em áreas focais e multifocais nas lamelas secundárias nas regiões proximal e distal à lamela primária e vasodilatação (aneurisma) total na lamela secundária com congestão sanguínea e infiltração de leucocitária. Assim, como a vasodilatação, as alterações seguintes são respostas secundárias e crônicas, provavelmente pelo fato do pesticida estar presente por um período mais longo no ambiente. O edema lamelar intersticial é causado pelo aumento da permeabilidade vascular, resultando na perda de componentes intersticiais e celulares do epitélio, visivelmente identificado pela coloração rosa amorfa (FIGURA 6, A). A lesão sempre esteve associada com as regiões que houve deslocamento de epitélio, apresentando alterações leves em áreas focais, multifocais e difusa, e alterações moderadas multifocais. As lamelas que apresentaram pronunciada hiperplasia entre as lamelas, levaram a fusão lamelar e ainda perda do epitélio das lamelas (FIGURA 6, C), a fusão mostrou padrões leves de alteração em áreas focais e alterações leves e moderadas em áreas multifocais. A proliferação de células epiteliais (FIGURA 6, B) foi uma lesão leve e ocorreu em áreas multifocais e difusas. A atrofia lamelar foi leve em áreas focais e multifocais (FIGURA 6, D).

FIGURA 6. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE *O. niloticus* EM ÁREAS SUSCEPTÍVEIS A CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS. A) DESLOCAMENTO DE EPITÉLIO (DE) E EDEMA INTERSTICIAL (EI) EM FILAMENTOS BRANQUIAIS SECUNDÁRIOS. B) ESPESSAMENTO DAS LAMELAS (EL) SECUNDÁRIAS, PRESENÇA DE DILATAÇÃO CAPILAR (DC) EM LAMELA SECUNDÁRIA, E PROLIFERAÇÃO EPITELIAL (PE) COM 3 CAMADAS DE CÉLULAS. C) PRONUNCIADA HIPERPLÁSIA LAMELAR (HL) CAUSANDO A FUSÃO ENTRE AS LAMELAS (FL) SECUNDÁRIAS. D) ATROFIA LAMELAR. MICROSCOPIA ÓPTICA – 40X – HE.



FONTE: O autor (2017).

3.2.3 FÍGADO

As análises macroscópicas dos fígados, mostraram aspecto normal no tecido hepático, com alterações na coloração do órgão, variando de marrons opaco a manchas amareladas distribuídas em várias regiões do órgão.

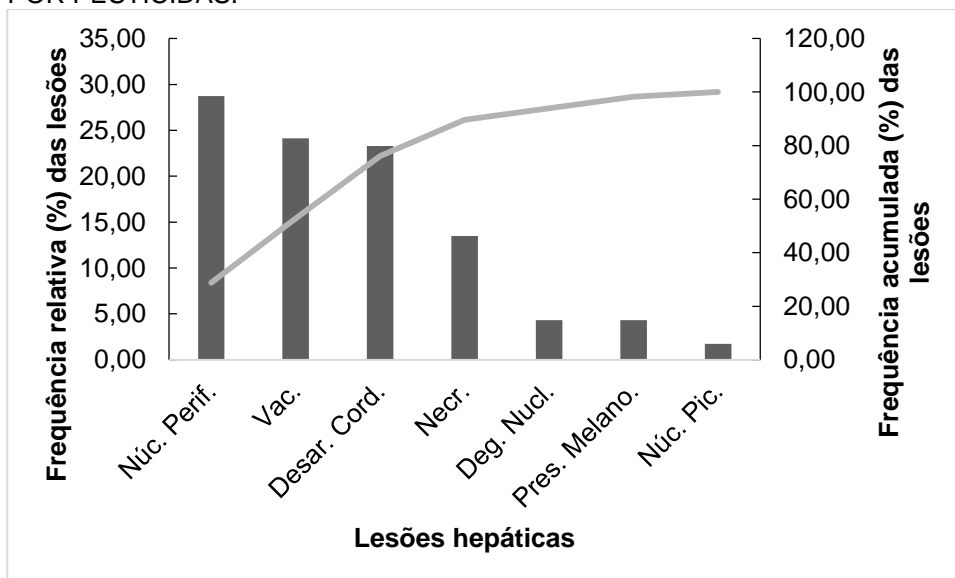
Na análise histopatológica hepática foram detectados sete tipos de alterações, cuja frequência de ocorrência não variou entre as cinco propriedades analisadas ($G_w = 217,07$; $p = 0,597$). No total, a frequência de ocorrência dos diferentes tipos de alterações observadas foram significativamente distintas ($X^2 = 348$; $p < 0,0001$), sendo observado deslocamento do núcleo para a região periférica do hepatócito em 100% das amostras, vacuolização em 84%, e desarranjo cordonal em 81%. O conjunto destas três alterações representou aproximadamente 80% das lesões encontradas.

Destaca-se ainda necrose tecidual em 47% das amostras, melanomacrófagos em 15%, degeneração nuclear em 15% e núcleo picnótico em 6% (FIGURA 7).

Quanto as lesões mais representativas, todos os indivíduos coletados apresentaram núcleos periféricos com alterações leves, moderadas e acentuadas, em áreas multifocais dos órgãos (FIGURA 8 B). Já para vacuolização dos hepatócitos, foi observado alterações leves em áreas focais, alterações leves, moderadas e acentuadas em áreas multifocais e alterações acentuadas em áreas difusas, com evidente tumefação celular, associada com o deslocamento dos núcleos para a região periférica da célula e sem coloração citoplasmática (FIGURA 8 B).

Os hepatócitos apresentam uma organização estrutural em forma de cordão acompanhando os sinusóides e nos animais analisados evidenciou-se um desarranjo desses cordões (FIGURA 8 D). A alteração estrutural apareceu em áreas multifocais aos níveis leves, moderados e acentuados, e em regiões próximas aos sinusóides (FIGURA 8 D), as alterações apareceram em um grau mais grave.

FIGURA 7. FREQUÊNCIA DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ENCONTRADAS EM FÍGADOS DE *O. niloticus* EM ÁREAS SUSCEPTÍVEIS A CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS.

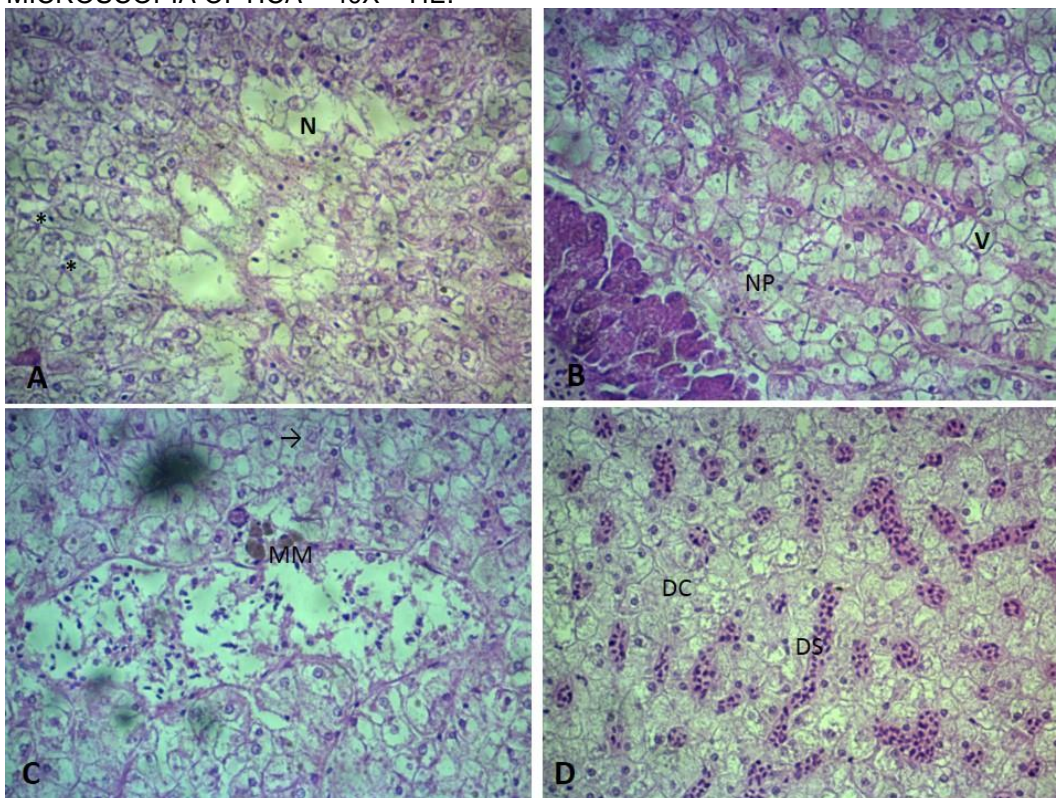


FONTE: O autor (2017).

A necrose tecidual (FIGURA 8 A) sendo uma lesão crônica, ocorreu em áreas focais com alterações leves, moderadas e acentuadas, e em áreas multifocais com alterações leves e moderadas. Acúmulo de melanomacrófagos (FIGURA 8 C) foram evidenciados em áreas focais e multifocais, com frequência de aparecimento leve à moderada, e estas alterações ocorreram próximas as áreas de necrose,

possivelmente atuando na remoção de restos celulares. Lesões que apresentaram danos irreversíveis apareceram em menor frequência como foi o caso da necrose e a degeneração nuclear (cariólise) (FIGURA 8 C), as características desta lesão foi facilmente identificada, pelo nítido aumento do volume nuclear e perda de material gênico, sem aspecto algum de cromatina nos núcleos, com alterações leves (início do processo) e moderadas (progressão do processo) em áreas focais e multifocais. Uma lesão pouco representativa foi a picnose nuclear (FIGURA 8 A), onde os núcleos picnóticos apresentaram aspectos de coloração mais intensos e menores que os núcleos normais dos hepatócitos, e foram encontrados em área focal com alterações de níveis leves e moderados.

FIGURA 8. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM FÍGADOS DE *O. niloticus* EM ÁREAS SUSCEPTÍVEIS A CONTAMINAÇÃO POR PESTICIDAS. A) NECROSE (N) TECIDUAL COM PERDA CELULAR EVIDENTE E REGIÃO COM INÍCIO DE NECROSE COM PRESENÇA DE NÚCLEOS PICNÓTICOS, INDICADOS PELO ASTERISCO (*). B) REGIÃO COM VACUOLIZAÇÃO (V) DOS HEPATÓCITOS, E DESLOCAMENTO DOS NÚCLEOS (NP) PARA A REGIÃO PERIFERIA DAS CÉLULAS. C) PRESENÇA DE MELANOMACRÓFAGOS (MM), PRÓXIMOS AO INÍCIO DE NECROSE TECIDUAL, E DEGENERAÇÃO NUCLEAR (SETA). D) DILATAÇÃO DOS SINUSÓIDES (DS) E DESARRANJO CORDONAL (DC) DOS HEPATÓCITOS, PROVAVELMENTE PROVENIENTES DA DILATAÇÃO DOS SINUSÓIDES E DOS HEPATÓCITOS. MICROSCOPIA ÓPTICA – 40X – HE.



FONTE: O autor (2017).

4 DISCUSSÃO

Variações dos parâmetros físico e químicos da água de cultivo podem desencadear fatores de estresse nos organismos aquáticos, causando mudanças na sua estrutura morfofisiológica (RABITTO et al., 2005), como observado em nossos resultados. Embora os valores de oxigênio dissolvido, temperatura e pH estejam dentro do recomendado para a produção de *O. niloticus* (SHELTON; POPMA, 2006), e as concentrações do pesticida glifosato estejam abaixo dos limites de detecção e quantificação da metodologia analítica (PEITER, 2017), pode-se observar um padrão na ocorrência e frequência de lesões dentre todas as propriedades analisadas, indicando potencial contaminação por pesticidas.

Entre as alterações patológicas encontradas, destaca-se a prevalência de micronúcleos nas células sanguíneas dos peixes analisados, as quais são relatadas na literatura em decorrência de exposição a diferentes concentrações subletais de compostos de pesticidas, elevando-se a frequência com o aumento da concentração e produzindo efeitos genotóxicos nos organismos aquáticos (PISTONE; EGUREN; RODRIGUEZ-ITHURRALDE, 2012; VERA-CANDIOTI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2013; BOGONI, et al., 2014; SADIQUL et al., 2016). Naqvi, Shoaib e Ali (2016), em estudo sobre potencial genotóxico de cinco pesticidas nos eritrócitos de *Oreochromis mossambicus*, observaram que todos os pesticidas desencadearam prevalência de micronúcleos nas células sanguíneas dos animais expostos, bem como elevaram a frequência de ocorrência com o aumento das concentrações. Resultados semelhantes também foram observados para as espécies *Cnesterodon decemmaculatus* (RUIZ DE ARCAUTE et al., 2016), *Danio rerio* (BOTELHO et al., 2015) e *Clarias gariepinus* (HARABAWY; IBRAHIM, 2014), indicando que mesmo em concentrações baixas, os efeitos genotóxicos dos pesticidas podem produzir respostas nos eritrócitos, pois esses compostos atuam diretamente durante o processo de divisão celular, resultando na fragmentação do núcleo e formação de micronúcleos.

Dentre as alterações patológicas observadas nas brânquias, a hiperplasia lamelar, espessamento lamelar e deslocamento de epitélio ocorrem como resposta primária dos organismos em decorrência a presença de um agente estressor, levando à uma diminuição da área de contato do órgão com o meio e consequente redução da absorção do pesticida (THOPHON et al., 2003). Neste sentido a elevada frequência

dessas alterações em nossas amostras indicam a potencial ocorrência de pesticidas na água. Estudos prévios ao promoverem a exposição de diferentes espécies de peixes a diferentes tipos de pesticidas e concentrações observaram resultados semelhantes, indicando padrão de lesões histopatológicas subagudas e crônicas das brânquias em resposta ao estresse químico oriundo da contaminação (DEVI; MISHRA, 2013; GABER et al., 2014; BHUVANESHWARI; PADMANABAN; BABU RAJENDRAN, 2015; STOYANOVA et al., 2015; CAMPOS-GARCIA et al., 2016; MURUSSI et al., 2016; NOVELLI et al., 2016; TABASSUM et al., 2016).

Embora as alterações morfofisiológicas desencadeadas em órgão de contato direto com o meio, como as brânquias, caracterizem-se como resposta primária a contaminação de pesticidas, reduzindo a absorção do contaminante, não evitam a metabolização do mesmo, ocorrendo então reflexos diretos sobre órgão internos de intensa atividade metabólica como o fígado. O aumento no tamanho dos hepatócitos, com deslocamento dos núcleos para a região periférica da célula, pelo aumento do volume celular, é um evidente indício da contaminação por pesticidas e sua influência sobre o metabolismo hepático, como foi observado por SHIOGIRI (2015), na espécie *O. niloticus* em concentrações subletais de pesticidas. Da mesma forma a vacuolização e o desarranjo cordonal dos hepatócitos, especialmente próximos aos sinusóides podem ser reflexo direto de alterações estruturais sofrida no sinusóide. A dilatação dos sinusóides pode ser resultado da alteração do tamanho dos hepatócitos, esse aumento leva a redução na atividade de excreção da bile, ocasionando bilestase nos hepatócitos e conseqüentemente a necrose, e por sua vez, os hepatócitos mais próximos aos sinusóides produzem respostas mais efetivas (maior grau de lesão) por receberem diretamente os pesticidas e em concentrações maiores, uma vez que os sinusóides são responsáveis pela distribuição sanguínea no fígado.

A influência dos sinusóides sobre o desarranjo cordonal e a vacuolização atuam de formas diferentes. O desarranjo cordonal ocorre devido a dilatação dos sinusóides, e a vacuolização está diretamente relacionada com as concentrações e mudanças que ocorrem com os componentes citoplasmáticos, muitas vezes em respostas aos compostos metabolizados pelo fígado, e próximos as regiões dos sinusóides em frequências maiores pela concentração elevada de resíduos trazidos pelo sangue, o que corrobora com resultados obtidos com exposição de peixes a diferentes concentrações e diferentes pesticidas (SAMANTA et al., 2015; SAMANTA et al., 2016; TABASSUM et al., 2016).

Lesões mais graves, severas e crônicas, como a perda de tecido hepático com presença de células específicas na remoção das células necrosadas, degradação ou desestruturação do material genético, apresentaram uma frequência menor e podem estar relacionadas a respostas fisiológicas produzidas pelo organismo, ou pelas baixas concentrações dos pesticidas no tanque de cultivo. Entretanto cabe destacar que o recebimento desses compostos possa ser gradativo, ocorrendo com frequências ao longo do ciclo de produção, e culminando na deposição cumulativa nos organismos, podendo aumentar a sua expressão, acarretando no aparecimento de lesões agudas e crônicas com o aumento das concentrações tóxicas ao longo do tempo (SILVA et al., 2014; SABAE; MOHAMED, 2015; ULLAH et al., 2015; KARMAKAR et al., 2016; KUMAR et al., 2016; KUMAR et al., 2016; MAISANO et al., 2016; PIRBEIGI et al., 2016; YANCHEVA et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados evidenciam alterações citopatológicas de hemácias, e histopatológicas de brânquias e fígado em *O. niloticus* potencialmente decorrentes da exposição a pesticidas. Embora, os resultados de detecção do pesticida glifosato estejam abaixo dos limites de detecção e quantificação da metodologia analítica (PEITER, 2017), a frequência de ocorrência, tipos e o grau de severidade das lesões observadas indicam potencial contaminação por pesticidas. Além disto, as características dos tanques e o relevo das propriedades propiciam a contaminação por pesticidas provenientes da atividade agrícola, devido à proximidade área de plantio e local de cultivo dos peixes. As alterações encontradas nos tecidos de *O. niloticus* podem ser consideradas indicadores biológicos de contaminação aquática por pesticidas na produção de peixes em cativeiro.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9898**: preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores - Procedimento. Rio de Janeiro, 1987. Disponível em: abntcolecao.com.br/ufpr. Acesso em: 10 jan. 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA – ABRASCO. Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012. 88p.
- BELO, M. S. S. P.; PIGNATI, W.; DORES, E. F. G. C.; MOREIRA, J. C.; PERES, F. Uso de Agrotóxicos na Produção de Soja do Estado do Mato Grosso: um estudo preliminar de riscos ocupacionais e ambientais. **Revista Brasileira Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 78-88, 2012.
- BHUVANESHWARI, R.; PADMANABAN, K.; BABU RAJENDRAN, R. Histopathological Alterations in Muscle, Liver and Gill Tissues of Zebra Fish *Danio rerio* due to Environmentally Relevant Concentrations of Organochlorine Pesticides (OCPs) and Heavy Metals. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, n. 4, p. 1365-1372, 2015.
- BOGONI, J. A.; ARMILIATO, N.; ARALDI-FAVASSA, C. T.; TECHIO, V. H. Genotoxicity in *Astyanax bimaculatus* (Twospot Astyanax) exposed to the waters of Engano river (Brazil) as determined by micronucleus tests in erythrocytes. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 66, n. 3, p. 441-449, 2014.
- BOTELHO, R. G. **Avaliação da Qualidade da Água do Rio Piracicaba (SP) e Efeito da Vinhaça para Organismos Aquáticos Antes e Pós a Correção do pH**. 2013. 107p. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- BOTELHO, R. G.; MONTEIRO, S. H.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; MOURA-ANDRADE, G. C. R.; TORNISIELO, V. L. Environmentally relevant concentrations of atrazine and ametryn induce micronuclei formation and nuclear abnormalities in erythrocytes of fish. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 69, n. 4, p. 577-585, 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016, v. 1, 2016.
- BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; GOMES, J. A. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **ACTA Amazonica**, v. 36, n. 03, p. 357-364, 2006.

CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D. S. T.; REZENDE, K. F. O.; SILVA, J. R. M. C.; ALVES, O. L.; BARBIERI, E. Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 481-488, 2016.

CANTANHÊDE, S. M.; MEDEIROS, A. M.; FERREIRA, F. S.; FERREIRA, J. R. C.; ALVES, L. M. C.; CUTRIM, M. V. J.; SANTOS, D. M. S. Uso de Biomarcador Histopatológico em Brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na Avaliação da Qualidade da Água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís – MA. **Revista Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 66, n. 02, p. 593-601, 2014.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Ed.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. cap. 3, p. 89-188.

CASTRO, J. S.; SILVA, J. S.; FREITAS, L. C.; CARVALHO-NETA, R. N. F. Biomarcadores histopatológicos na espécie *Hoplias malabaricus* (Pisces, Osteichthyes, Erythrinidae) em uma Unidade de Conservação de São Luís (MA). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.6, p.1687-1694, 2014.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais Aspectos da Poluição de Rios Brasileiros por Pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1296-1301, 2014.

DEVI, Y.; MISHRA, A. Histopathological alterations in gill and liver anatomy of fresh water, air breathing fish *Channa punctatus* after pesticide Hilban®(Chlorpyrifos) treatment. **Adv. Biores**, v. 4, n. 2, p. 57-62, 2013.

GABER, H. S.; ABBAS, W. T.; AUTHMAN, M. M. N.; GABER, S. A. Histological and biochemical studies on some organs of two fish species in Bardawil Lagoon, North Sinai, Egypt. **Global Veterinaria**, v. 12, p. 1-11, 2014.

GAMA, A. F.; OLIVEIRA, A. H. B.; CAVALCANTE, R. M. Inventário de Agrotóxicos e Risco de Contaminação Química dos Recursos Hídricos no Semiárido Cearense. **Química Nova**, v. 36, n. 03, p. 462-467, 2013.

HARABAWY, A. S. A.; IBRAHIM, A. T. A. Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): hematological, biochemical and cytogenetic response. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 103, p. 61-67, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília: Ibama, v. 02, 2010. 84 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA – INCA. Ministério da Saúde. **Acerca dos Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, n. 10, 2015. 5 p.

INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **Indicadores ambientais por bacias hidrográficas do Estado do Paraná** / Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Curitiba: IPARDES, 2010. 223 p.

JEBAL, G. T.; MOREJON, C. F. M. Potencial de Geração e Aproveitamento de Rejeito Sólido Domiciliar na Região Oeste do Paraná. **5th International Workshop | Advances in Cleaner Production – Academic Work**, 2015.

KARMAKAR, S.; PATRA, K.; JANA, S.; MANDAL, D. P.; BHATTACHARJEE, S. Exposure to environmentally relevant concentrations of malathion induces significant cellular, biochemical and histological alterations in *Labeo rohita*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 126, p. 49-57, 2016.

KUMAR, N.; AMBASANKAR, K.; KRISHNANI, K. K.; GUPTA, S. K.; BHUSHAN, S.; MINHAS, P. S. Acute toxicity, biochemical and histopathological responses of endosulfan in *Chanos chanos*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 131, p. 79-88, 2016.

KUMAR, N.; SHARMA, R.; TRIPATHI, G.; KUMAR, K.; DALVI, R. S.; KRISHNA, G. Cellular metabolic, stress, and histological response on exposure to acute toxicity of endosulfan in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Environmental toxicology**, v. 31, n. 1, p. 106-115, 2016.

LIMA, F. P. C. Reversão sexual em tilápias (*Oreochromis niloticus*). **Conexão ciência (Online)**, v. 6, n. 1, p. 105-110, 2011.

LIU, J.; LU, G.; YANG, H.; YAN, Z.; WANG, Y.; WANG, P. Bioconcentration and metabolism of ketoconazole and effects on multi-biomarkers in crucian carp (*Carassius auratus*). **Chemosphere**, v. 150, p. 145-151, 2016.

MAISANO, M.; CAPPELLO, T.; OLIVA, S.; NATALOTTO, A.; GIANNETTO, A.; PARRINO, V.; BATTAGLIA, P.; ROMEO, T.; SALVO, A.; SPANÒ, N.; MAUCERI, A. PCB and OCP accumulation and evidence of hepatic alteration in the Atlantic bluefin tuna, *T. thynnus*, from the Mediterranean Sea. **Marine environmental research**, v. 121, p. 40-48, 2016.

MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M.; MARCHEZAN, M. G. Resíduos de Agrotóxicos na Água de Rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 05, p. 1053-1059, 2010.

MURUSSI, C. R.; COSTA, M. D.; LEITEMPERGER, J. W.; FLORES-LOPES, F.; MENEZES, C. C.; LOEBENS, L.; AVILA, L. A.; RIZZETTI, T. M.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Acute exposure to the biopesticide azadirachtin affects

parameters in the gills of common carp (*Cyprinus carpio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 180, p. 49-55, 2016.

NAQVI, G. Z.; SHOAIB, N.; ALI, A. M. Genotoxic Potential of Pesticides in the Peripheral Blood Erythrocytes of Fish (*Oreochromis mossambicus*). **Pakistan J. Zool**, v. 48, n. 6, p. 1643-1648, 2016.

NOVELLI, A.; VIEIRA, B. H.; BRAUN, A. S.; MENDES, L. B.; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1408-1414, 2016.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **RevInter Revista de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 02, n. 01, p. 71-89, 2009.

PEITER, G. C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de glifosato e AMPA em águas**. 2017. 77f. Dissertação (Mestrado Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais) – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2017.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.

PIRBEIGI, A.; POORBAGHER, H.; EAGDERI, S.; MIRVAGHEFI, A. R. Pathological effects of sublethal diazinon on the blood, gill, liver and kidney of the freshwater fish *Capoeta damascina*. **Chemistry and Ecology**, v. 32, n. 3, p. 270-285, 2016.

PISTONE, G.; EGUREN, G.; RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D. Inhibition, recovery and field responses of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) brain cholinesterases upon exposure to azinphos-methyl. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 2, 2012.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.147-156, 2005.

RIBEIRO, E. A. **Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (BENZENO, TOLUENO E XILENO) no peixe *Sphoeroides testudineus* (LINNAEUS, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos**.2007. 61f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RODRIGUES, K. F.; RIPPEL, R. Crescimento Econômico e Recursos Hídricos: um estudo da agropecuária na Bacia do Paraná III. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, v. 34, n. 125, p. 191-212, 2013.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology**. 6 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 1-21.

RUIZ DE ARCAUTE, C.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Toxic and genotoxic effects of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 128, p. 222-229, 2016.

SABAE, S. Z.; MOHAMED, F. A. S. Effect of Environmental Pollution on the Health of *Tilapia* spp. from Lake Qarun. **Global Veterinaria**, v. 14, n. 3, p. 304-328, 2015.

SADIQUL, I. M.; FERDOUS, Z.; NANNU, M. T. A.; MOSTAKIM, G. M.; RAHMAN, M. K. Acute exposure to a quinalphos containing insecticide (convoy) causes genetic damage and nuclear changes in peripheral erythrocytes of silver barb, *Barbonymus gonionotus*. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 949-956, 2016.

SALVO, L. M.; MALUCELLI, M. I. C.; SILVA, J. R. M. C.; ALBERTON, G. C.; ASSIS, H. C. S. Toxicity Assessment of 2,4-D and MCPA Herbicides in Primary Culture of Fish Hepatic Cells. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 50, p. 449-455, 2015.

SAMANTA, P.; BANDYOPADHYAY, N.; PAL, S.; MUKHERJEE, A. K.; GHOSH, A. R. Histopathological and ultramicroscopical changes in gill, liver and kidney of *Anabas testudineus* (Bloch) after chronic intoxication of almix (metsulfuron methyl 10.1%+ chlorimuron ethyl 10.1%) herbicide. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 122, p. 360-367, 2015.

SAMANTA, P.; MUKHERJEE, A. K.; PAL, S.; KOLE, D.; GHOSH, A. R. Toxic effects of glyphosate-based herbicide, Excel Mera 71 on gill, liver, and kidney of *Heteropneustes fossilis* under laboratory and field conditions. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 4, n. 3, p. 147-155, 2016.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SHELTON, W. L.; POPMA, T. J. Biology. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. (Eds.). **Tilapia: biology, culture and nutrition**. New York – NY, USA: Food Products Press, 2006. cap. 1, p. 1-49.

SHIOGIRI, N. S. **Toxicidade, eficácia e efeitos morfofuncionais do antimicrobiano azitromicina para a tilápia *Oreochromis niloticus***. 2015. 101f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2015.

SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; BARALDI, F. G.; DA CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 388-396, 2012.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES-JUNIOR, A. J.; MUNGIOLI, R. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, v. 35, p. 421-463, 2012.

SILVA, M. D.; ROSSI, S. C.; GHISI, N. C.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M.; ASSIS, H. C. S. Using multibiomarker approach as a tool to improve the management plan for a Private Reserve of Natural Heritage (RPPN). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 92, n. 5, p. 602-608, 2014.

SOUSA, D. B.; ALMEIDA, Z. S.; CARVALHO-NETA, R. N. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da costa maranhense, Brasil. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 65, n. 2, p. 369-376, 2013.

STOYANOVA, S.; YANCHEVA, V. S.; VELCHEVA, I.; UCHIKOVA, E.; GEORGIEVA, E. Histological Alterations in Common Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) Gills as Potential Biomarkers for Fungicide Contamination. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 5, p. 757-764, 2015.

TABASSUM, H.; DAWOOD, A. Q.; SHARMA, P.; KHAN, J.; RAISUDDIN, S.; PARVEZ, S. Multi-organ toxicological impact of fungicide propiconazole on biochemical and histological profile of freshwater fish *Channa punctata* Bloch. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 359-365, 2016.

TAVELLA, L. B.; SILVA, I. N.; FONTES, L. O.; DIAS, J. R. M.; SILVA, M. I. L. O Uso de Agrotóxicos na Agricultura e suas Consequências Toxicológicas e Ambientais. **ACSA – agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 07, n. 02, p. 06-12, 2011.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121, n. 3, p. 307-320, 2003.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 388, n. 1, p. 85-95, 1997.

ULLAH, R.; ZUBERI, A.; NAEEM, M.; ULLAH, S. Toxicity to hematology and morphology of liver, brain and gills during acute exposure of Mahseer (*Tor putitora*) to cypermethrin. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 17, p. 199-204, 2015.

VERA-CANDIOTI, J.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-

bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 89, p. 166-173, 2013.

VIRGENS, A. C.; CASTRO, R. L.; CRUZ, Z. M. A. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida. **Natureza on line**, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

YANCHEVA, V.; VELCHEVA, I.; STOYANOVA, S.; GEORGIEVA, E. Histological biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: a review. **APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH**, v. 14, n. 1, p. 47-75, 2016.

YASUI, G. S.; SANTOS, L. C.; FILHO, O. P. R.; SHIMODA, E.; ARIAS-RODRIGUEZ, L. Cultivo monossesual de tilápias: importância e obtenção por sexagem e inversão sexual. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v. 49, n. 51, p. 46-69, 2006.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th Edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2010, 944 p.