

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E DA CAPACIDADE DE
RECUPERAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D COMERCIAL (2,4-
diclorofenoxiacético) EMPREGANDO BRÂNKUIAS DE
TILÁPIAS, *Oreochromis niloticus*, COMO BIOMARCADOR**

ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Março/2014

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E DA CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO
DO HERBICIDA 2,4-D COMERCIAL (2,4-diclorofenoxiacético)
EMPREGANDO BRÂNQUIAS DE TILÁPIAS, *Oreochromis niloticus*, COMO
BIOMARCADOR**

ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Março/2014

574.82 Marcato, Ana Claudia de Castro
M313i Investigação da toxicidade e da capacidade de
recuperação do herbicida 2,4-D comercial
(2,4-diclorofenoxiacético) empregando brânquias de tilápias,
Oreochromis niloticus, como biomarcador / Ana Claudia de
Castro Marcato. - Rio Claro, 2014
74 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Histologia. 2. Ultramorfologia. 3. Histopatologia. 4.
Hipertrofia. 5. Célula clorídrica. 6. Recuperação. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

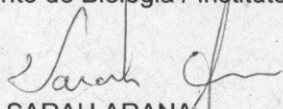
TÍTULO: INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE DO HERBICIDA 2,4-D COMERCIAL UTILIZANDO BRÂNKIAS DE TILÁPIAS COMO MODELO

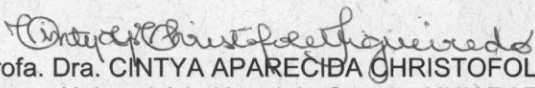
AUTORA: ANA CLAUDIA DE CASTRO MARCATO

ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Profa. Dra. SARAH ARANA
Departamento de Histologia e Embriologia / Instituto de Biologia, UNICAMP


Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO
Centro Universitário Herminio Ometto, UNIARARAS

Data da realização: 20 de fevereiro de 2014.

Alterado para: investigação da toxicidade e da capacidade de recuperação ao herbicida 2,4-D comercial (2,4-diclorofenoxiacético) empregando brânquias de tilápias, Oreochromis niloticus, como biomarcador

Aos meus amados pais e irmão, dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha família, que me incentivou a seguir meu sonho, que me ensinou a ser tudo aquilo que sou; mostrou-me as coisas em que devo acreditar e que me ensinou a ter Fé. Fé em Deus, fé nas pessoas, fé nas atitudes e ações e fé no mundo.

Quero agradecer aos amigos que fiz durante esses 2 anos de mestrado, por que sem eles, a minha sanidade mental já teria sido perdida para sempre.

Em especial, agradeço à Mão (Rafael) e Allison pela companhia diária, sejam nos melhores como nos piores momentos, nas melhores gargalhadas e nos piores choros, nas conversas mais inteligentes ou não, nos melhores assuntos ou não. Agradeço ao Léo por ter sido paciente e amigo nas minhas loucuras, e ao Jorge por suportar inclusive minhas piores TPMs. De uma forma geral, a todos que fazem parte do LabMut, Citogenética, Molecular e Histologia, sem cada um de vocês esses dias não teriam suas pitadas de diversão.

Agradeço a todos os fofos, Janaína, Cintya, Raphael, Annelise, Júlia, Jorge, Cristina, Vinícius, Nilton, Yadira, Cleiton e Thays, por estarem sempre disponível para ajudar como para fofocar, por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida, vocês são essenciais.

Agradeço os técnicos pela paciência e compreensão nos momentos de trabalho e pela diversão nos momentos de lazer, Gerson, Roberta, Monika, Antônio e Pablo.

Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento ao projeto nº 2011/14881-3.

Por fim, agradeço a Carmem, minha orientadora, que me orientou em mais essa jornada e que me ensinou muito mais que o profissional. Obrigada pela amizade, pela dedicação, pelas broncas e pelo carinho.

"Se não nos deixarem sonhar, não os deixaremos dormir".

Eduardo Galeano

RESUMO

A água é um dos fatores essenciais para a manutenção das funções vitais dos seres vivos. Tem-se observado um crescente comprometimento da qualidade deste recurso, devido à poluição de muitos mananciais e até de bacias hidrográficas inteiras, seja por resíduos industriais, esgoto doméstico, ou ainda, por substâncias utilizadas na agricultura, tais como pesticidas, herbicidas e fertilizantes. Há mais de 50 anos, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é usado em todo o mundo; dentre estes usos, foi um dos compostos do “agente laranja” utilizado na Guerra do Vietnã. Pelo fato de ter sua genotoxicidade comprovada por diversos estudos e pela sua longa persistência no solo, que possibilita a lixiviação e a percolação do composto afetando corpos hídricos, estudos que avaliem sua toxicidade são relevantes e justificáveis. Os peixes são excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, pois alertam sobre o potencial perigo de substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo expor tilápias a duas concentrações do herbicida 2,4-D para avaliação dos impactos provocados pela presença deste composto sobre a vida aquática; também foi objetivo deste verificar se a retirada do composto favorece a recuperação desses animais. Para tanto, 45 peixes da espécie *Oreochromis niloticus* foram expostos em aquários com concentrações de 0 mg/L, 250 mg/L e 500 mg/L de 2,4-D. Decorrido 96 horas de exposição, cinco animais de cada aquário foram anestesiados e eutanasiados para a análise histopatológica das brânquias e os 10 animais restantes de cada aquário foram transferidos para aquários com água limpa para a recuperação por períodos de 96 e 192 horas; após cada período de recuperação foram realizadas nova coleta. As brânquias foram analisadas por meio de técnicas ultramorfológica, histológica e histoquímicas. A análise ultramorfológica das brânquias dos animais expostos às concentrações do herbicida 2,4-D revelou diferentes tipos de células clorídricas e a hipertrofia das células pavimentosas das lamelas secundárias; a análise histológica do tecido apresentou, em ambos os tratamentos, desprendimento epitelial nas lamelas secundárias das brânquias de todos os animais expostos ao 2,4-D, assim como hipertrofia das células do epitélio e presença de células clorídricas entre estas células; a frequência dessas alterações foi inversamente proporcional à concentração a qual foram expostos. Pela análise histoquímica foi possível observar que o herbicida induziu a proliferação de células mucosas em todos os animais expostos, sem relação dose-dependente. Os animais submetidos aos períodos de recuperação apresentaram regressão total das alterações encontradas após a exposição, sendo esta recuperação mais efetiva após 192 horas. Portanto, os resultados sugerem que a retirada do herbicida 2,4-D do ambiente pode reverter o quadro de histopatologia causada nos peixes.

Palavras-chave: ultramorfologia, histopatologia, hipertrofia, célula clorídrica, recuperação.

ABSTRACT

Water is one of the essential factors to the maintenance of the vital functions of the living beings. It has been observed an increasing impairment of this resource, due to the pollution of several wellsprings and even entire watersheds, either by industrial residues, domestic sewage or even by substances used in the agriculture, such as pesticides, herbicides and fertilizers. For over 50 years, the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is used worldwide; and it was one of the compounds of the “agent orange” used in the Vietnam War. Since its genotoxicity was proven by several studies and due to its long persistence in the soil, which enables the leaching and percolation of the compound affecting the hydric bodies, studies that assess its toxicity are relevant and justified. Fishes are excellent experimental models for the study of aquatic toxicology, since they alert for the potential danger of chemical substances or to the possibility of environmental pollution. In this context, the present study aimed to expose tilapias to two concentrations of the herbicide 2,4-D to assess the impacts provoked by the presence of this compound on the aquatic life; it was also objective of this study verify if the withdrawal of the compound favours the recovery of these animals. For this purpose, 45 fishes of the species *Oreochromis niloticus* were exposed in aquariums with the concentrations of 0 mg/L, 250 mg/L and 500 mg/L of 2,4-D. After 96 hours of exposure, five animals of each aquarium were anesthetized and sacrificed for the histopathological analysis of the gills and the 10 remaining animals of each aquarium were transferred to aquariums with clean water for recovery for periods of 96 and 192 hours, after each recovery period, 5 animals of each aquarium were anesthetized, sacrificed and the gills were removed for histopathology analysis. The gills were analyzed by techniques of ultramorphology, histology and histochemistry. The ultramorphological analysis of the gills of the animals exposed to the concentrations of the herbicide 2,4-D showed different types of chloridric cells and hypertrophy of the pavement cells of the secondary lamellae; the histological analysis of the tissue presented, in both treatments, epithelial detachment in the secondary lamellae of the gills of all the animals exposed to 2,4-D, as well as hypertrophy of the epithelium cells and the presence of chloridric cells between these cells; the frequency of these alterations was inversely proportional to the concentration to which they were exposed. By the histochemical analysis it was possible to observe that the herbicide induced the proliferation of mucous cells in all the animals exposed, without dose-dependent relationship. The animals submitted to the recovery periods presented total regression of the alterations found after the exposure, and this recovery was more effective after 192 hours. Thus, the results suggest that the removal of the herbicide 2,4-D from the environment can revert the histopathology caused in the fishes.

Key-words: ultramorphology, histopathology, hypertrophy, chloridric cell, recovery.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Água	14
2.2. Peixes como bioindicadores e brânquias como biomarcadores	15
2.3. O herbicida 2,4-D	18
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Material biológico	36
4.2. Produto testado	36
4.3. Bioensaio	36
4.4. Ultramorfologia	37
4.5. Histologia das brânquias	37
4.6. Histoquímica	38
4.7. Análise e documentação dos resultados	38
6. RESULTADOS	41
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
Figura 1	62
Figura 2	63
Figura 3	64
Figura 4	65
Figura 5	66
Figura 6	67
Tabela 2	68
Tabela 3	69
Tabela 4	70
Tabela 5	71
Tabela 6	72
Tabela 7	73
Tabela 8	74

1. INTRODUÇÃO

As emissões de contaminantes no ar, no solo e principalmente nas águas estão relacionadas aos processos naturais e, principalmente, às atividades humanas. As fontes de poluição podem ser classificadas em pontuais e não pontuais (HOLT, 2000). Dentre as fontes pontuais podemos citar as diversas estações de tratamento, de efluentes industriais, redes de esgoto doméstico, derramamentos acidentais e mineração. As emissões de fontes pontuais são mais facilmente detectadas e controladas e, geralmente, resultam em descargas diretas dos contaminantes nos corpos d'águas. Ao contrário, as emissões de fontes não pontuais são de difícil controle, variam com o tempo e espaço e podem envolver rotas que resultam na deposição parcial dos contaminantes antes deles atingirem os corpos d'águas. Um exemplo típico de fonte não pontual é a utilização de agrotóxicos no solo (COSTA; OLIVI, 2008).

A qualidade dos ecossistemas aquáticos tem sido alterada em diferentes escalas nas últimas décadas, fator este desencadeado pela complexidade dos usos múltiplos da água pelo homem, os quais acarretam em degradação ambiental significativa e diminuição considerável na disponibilidade de água de qualidade, produzindo inúmeros problemas ao seu aproveitamento (PEREIRA, 2004).

Atualmente, vem sendo observado um crescente comprometimento da qualidade da água, devido à poluição de muitos mananciais e até de bacias hidrográficas inteiras, seja por resíduos industriais, esgoto doméstico, ou ainda, por substâncias utilizadas na agropecuária, tais como pesticidas, herbicidas e fertilizantes.

A intensificação do uso de agrotóxicos nas últimas décadas e os efeitos danosos desses agentes químicos ao homem e ao ambiente fez com que vários países regulamentassem seu uso e sua produção, com o objetivo de minimizar as consequências danosas nos ecossistemas. Para tanto, cada país instituiu comissões ou comitês multidisciplinares e organizações com características administrativas legais para avaliar o nível de periculosidade e os riscos que esses produtos impõem ao homem e ao ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os pesticidas clorofenoxiácidos constituem importante classe de herbicidas, apresentando normalmente um longo tempo de atividade residual em solos e águas, persistindo por vários meses devido à sua baixa atividade microbiológica (SANCHEZ-BRUNETE et al., 1994), sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) um membro desta classe; tal composto é altamente seletivo, sistêmico e pré ou pós-emergente (TOMLIN, 1994).

Do ponto de vista ecológico, os métodos mais relevantes para avaliação da toxicidade de contaminantes são aqueles que determinam alterações na estrutura e função dos ecossistemas (KELLY; HARWELL, 1989). Entretanto, tais determinações são difíceis de serem elucidadas, possuem um alto custo, exigem muito tempo e raramente são preditivas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Sendo assim, segundo estes autores, quando uma alteração significativa é evidenciada, o ecossistema já deve estar severamente danificado.

Estudos de biomonitoramento ambiental, com diferentes organismos teste, têm sido cada vez mais requeridos para avaliar o real impacto de uma substância (ou composto) sobre a saúde dos organismos, uma vez que as análises químicas apenas detectam a presença e quantidade desta substância. Diversas espécies de invertebrados e peixes têm sido empregadas nas avaliações da ecotoxicologia aquática (DAVID; FONTANETTI, 2005; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006; DAVID et al., 2008; HOSHINA et al., 2008; BIAGINI et al., 2009; NOGAROL et al., 2012) e tem sido considerados bons modelos para estudo de impacto ambiental (MALLAT, 1985; EVANS, 1987; LAURENT; PERRY, 1991; McKIM; ERICKSON, 1991; WENDERLAAR BONGA; LOCK, 1991; FONTANETTI et al., 2012).

As brânquias dos peixes são o principal alvo de vários poluentes aquáticos (KIKUCHI et al., 1978), sendo seu epitélio, um excelente modelo para examinar os efeitos de substâncias dissolvidas nos tecidos (EVANS, 1987). Além disso, as brânquias são os órgãos mais afetados por seu contato constante com a água (MISHRA et al., 1985), por isso, são geralmente considerados bons indicadores da qualidade da água (RANKIN et al., 1982).

As alterações histológicas observadas nas brânquias dos peixes são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados por exposição a diferentes poluentes (ARELLANO et al., 1999). Como a brânquia é o principal local de troca gasosa e de função importante na regulação iônica, as alterações morfológicas causadas pela exposição aos poluentes resultam em distúrbios respiratórios (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002). Perry e Laurent (1993) consideram que as alterações morfológicas das brânquias, ocorrem durante as mudanças ambientais, como forma adaptativa de tentar conservar algumas das suas funções fisiológicas.

Sendo o 2,4-D amplamente utilizado na agricultura, ser considerado mutagênico e ter longa persistência no solo, que pode ser de vários meses, aumentando a possibilidade de lixiviação e/ou percolação do composto comprometendo corpos hídricos, o estudo de sua

toxicidade torna-se relevante e justificado. Assim, diante do exposto, este projeto teve como finalidade observar se a presença do herbicida 2,4-D no ambiente aquático pode causar alguma reação adversa em peixes e se a retirada do mesmo reverte alguma possível alteração. Para isso, foram utilizadas análises ultramorfológica, histológica e histoquímica de brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), que responde rapidamente às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996) e é uma espécie comumente encontrada em inúmeros recursos hídricos de todo o mundo, importante por sua ampla comercialização na região sudeste do Brasil, particularmente em São Paulo (ALVES-COSTA, 2001).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A água

A água é um dos fatores essenciais para a manutenção das funções vitais dos seres vivos. Com o contínuo crescimento populacional e um consequente aumento no consumo da água, o uso racional desse bem mineral tem sido incentivado, visando uma conservação da qualidade de nossas águas, já que se trata de um recurso mineral finito (ESTEVES, 1998).

Desde os tempos de colônia e principalmente agora no século XXI, o agronegócio tem se destacado como um setor muito forte no Brasil, principalmente por sua natureza exportadora. Como consequência, tem se tornado um dos setores da economia que mais causa impacto ambiental, dado a necessidade de grandes porções de terras, uso excessivo de agroquímicos, bem como a geração de grande quantidade de resíduos, os quais podem conter elementos e substâncias potencialmente poluidoras (RIBEIRO et al., 2007; UNICA, 2007).

Atualmente, um dos temas de discussão mais relevantes na comunidade científica mundial é o impacto gerado pelas atividades humanas ao meio ambiente, influenciando a qualidade da água, do solo e do ar. O descarte de produtos tóxicos no meio ambiente leva a sérios danos aos organismos, aos ecossistemas terrestres e principalmente o aquático, uma vez que os ecossistemas de água doce, juntamente com os estuários, fornecem os sistemas mais baratos e convenientes para descarte de efluentes (ODUM, 1988). Em consequência disso, a preocupação em diagnosticar e monitorar a poluição ambiental aquática é crescente e de extrema importância.

Como o Brasil é rico em recursos hídricos, ainda há na população uma mentalidade de descaso e desperdício, sendo a água, devido sua propriedade como solvente universal, utilizada para descarte de efluentes urbanos e transporte de resíduos, que são muitas vezes tóxicos, levando a degradação dos ecossistemas aquáticos (WHITE; RASMUSSEN, 1998). Esses efluentes, principalmente os industriais, podem ter composições complexas podendo apresentar pesticidas e metais pesados, ocasionando sérios danos aos organismos (VEGA et al., 1996).

A contaminação aquática por dejetos industriais e domésticos é hoje, uma grande preocupação da saúde pública (MARIA et al., 2003), uma vez que o consumo de água contaminada, direto ou indireto, pode causar sérios danos aos organismos. Acredita-se que 80% de todas as moléstias, e mais de um terço dos óbitos dos países em desenvolvimento, sejam causados pelo consumo de água contaminada e que, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa é perdido devido às doenças relacionadas com a água. Esgotos e excrementos humanos

são os principais responsáveis pela deterioração da qualidade da água em países em desenvolvimento (BIAGINI et al., 2009).

Neste sentido, o manejo e a disposição de resíduos agroindustriais têm merecido destaque nos dias atuais, frente ao despejo inadequado e indiscriminado de muitos efluentes no meio ambiente (SRIVASTAVA; SAHAI, 1987).

2.2. Peixes como bioindicadores e brânquias como biomarcadores

Muitos organismos-teste vêm sendo utilizados para análise das condições ambientais, tais como cebola (SOUZA et al., 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2013), peixes (SOUZA; FONTANETTI, 2006; HOSHINA et al., 2008; BIAGINI et al., 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2009), moluscos (DAVID; FONTANETTI, 2005; DAVID et al., 2008; NOGAROL et al., 2012) e diplópodos (BOZZATTO; FONTANETTI, 2012; MERLINI et al., 2012; SOUZA; FONTANETTI, 2012).

O aumento da quantidade de contaminantes no ecossistema aquático necessita do entendimento do efeito biológico de xenobiontes na biota aquática (ALBUQUERQUE, 2007). Os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial perigo de substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental (POWERS, 1989). Além disso, os peixes acumulam substâncias químicas por exposição direta aos químicos presentes nas águas dos rios e mares, ou através da cadeia alimentar do ecossistema de maneira indireta (ATEEQ et al., 2002). Sendo assim, os peixes são intensamente utilizados como bioindicadores em avaliações de contaminação ambiental (FONTANETTI et al., 2012).

A tilápia (*Oreochromis* sp) é uma espécie nativa da África e foi introduzida no Brasil por volta de 1971, no Ceará (CASTAGNOLLI, 1992). A espécie *O. niloticus* (tilápia-do-nilo) é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África (CARVALHO et al., 2006); pertence à família Cichlidae (SANTOS, 1977), apresenta coloração cinza azulada, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas (GALLI; TORLONI, 1984). Segundo Costa-Pierce (2003), a característica principal que distingue *O. niloticus* é a presença de listras verticais por todo o comprimento da nadadeira caudal. É uma espécie de peixe cujo cultivo, bem como importância, vem crescendo, sendo atualmente um dos mais importantes cultivos em aquicultura do mundo, atrás apenas da cultura de carpas e salmónídeos. Além disso, é a espécie de tilápia cultivada mais importante,

representando mais de 80% da produção total de tilápias (MOUSA; MOUSA, 1999; AL-SHAMSI et al., 2006). Uma característica que torna vantajosa a criação de tilápias é a capacidade do organismo em obter um ótimo desenvolvimento em grandes concentrações populacionais, característica que diminui o custo de manutenção per capita (PONCE-MARBÁN et al., 2006).

A tilápia-do-nylo é um ótimo modelo para avaliação do ecossistema aquático e para realização de estudos toxicológicos (GIRÓN-PÉREZ et al., 2007). Os peixes, como um todo, são excelentes para este tipo de estudo, pois possuem a capacidade de retirar, estocar e bioacumular compostos e/ou poluentes em seus organismos (STREIT, 1998). Por possuírem essas propriedades, eles podem sinalizar o potencial perigo de novas substâncias químicas ou para a possibilidade de poluição ambiental. Podem ser mantidos em laboratório e são facilmente expostos à substâncias tóxicas de maneira similar a outros vertebrados superiores, podendo ser usados para a avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos (HARSHBARGER; CLARCK, 1990). Sendo assim, são considerados excelentes sistemas-teste para ensaios laboratoriais realizados para a investigação da toxicidade de substâncias contaminantes em ecossistemas aquáticos (ALVES-COSTA, 2001).

As alterações fisiológicas ou de outra natureza, nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo, são considerados biomarcadores de efeito, que podem ser reconhecidos associados a um comprometimento da saúde ou possível doença (NRC, 1987; WHO, 1993). Biomarcadores de efeito podem ser utilizados, quer para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos para a saúde devido à exposição externa e absorção de uma substância química (VAN der OOST et al., 2003).

As brânquias dos peixes são constituídas por filamentos ou lamelas primárias arranjados em arcos duplos ao longo do osso. As lamelas secundárias são originadas nos filamentos e estão dispostas perpendicularmente às margens inferior e superior de cada filamento, servindo mais para sustentação da lâmina secundária, do que para processos de trocas gasosas (ROSETY-RODRÍGUEZ et al., 2002).

O epitélio branquial é constituído por diferentes tipos celulares, incluindo células pavimentosas ou respiratórias, células mucosas e células clorídricas (também chamadas de mitochondrian rich cells), sendo estas últimas, em peixes de água doce, envolvidas em atividades

de transporte iônico (LAURENT et al., 1985; LAURENT; PERRY, 1990). O número, tamanho, forma e estrutura das células clorídricas podem ser modificados pela exposição a certos fatores ambientais (JAGOE; HAINES, 1997; BRITO, 2009). A determinação dos efeitos adversos pode ser realizada histopatologicamente, investigando lesões, alterações ou formação de tumores (neoplasias) nos tecidos dos peixes (VAN der OOST et al., 2003).

As células pavimentosas constituem a maior parte da superfície branquial; são caracterizadas por serem constituídas por cristas em suas superfícies, as quais, segundo Mallat (1985), são importantes na retenção de muco no epitélio branquial, como uma forma de proteção contra alterações ambientais.

Takashina e Hibiya (1995) relatam a hipersecreção de muco como sendo resultado de uma resposta crônica contra infecções parasitárias ou bacterianas ou contra produtos químicos irritantes. O muco é normalmente encontrado nos filamentos, mas pode ser encontrado no epitélio respiratório de peixes expostos a condições de estresse, o que pode sugerir que a camada formada pela produção de muco protege as superfícies lamelares contra os agentes tóxicos, infecciosos e partículas em suspensão (MALLAT, 1985). Devido à função de proteção do tecido que o muco apresenta (BERNET et al., 1999), o aumento de células mucosas é um indicativo de presença de substâncias tóxicas na água. Sendo assim, pode-se dizer que a produção de muco é uma resposta generalista para exposição à poluição e, mesmo sem uma ligação entre essas alterações e contaminantes específicos, este controle fornece uma ferramenta útil para o monitoramento biológico (DAVID; FONTANETTI, 2009).

A célula clorídrica é uma dos quatro tipos de células diferenciadas presentes no epitélio branquial (PISAM, RAMBOURG, 1991; PERRY, LAURENT, 1993). Os outros tipos celulares são as células pavimentosas, células mucosas e células neuroepiteliais (BAILLY et al., 1992).

Segundo Perry (1997), as células clorídricas são observadas no epitélio dos filamentos e, em particular, estão concentradas nas regiões interlamelares e nas junções entre o filamento e a lamela. Normalmente, as células clorídricas são distribuídas de maneira esparsa pela lamela; entretanto, em condições de proliferação, as lamelas podem apresentar maior número dessas células e, conseqüentemente, impedir a difusão dos gases respiratórios. A função primária dessas células, segundo a literatura, é a troca de íons com o meio (MORGAN, 1994; MORGAN 1995; CHANG et al., 2002; GOSS et al., 1992a; GOSS et al., 1992b; PERRY; GOSS, 1994).

Segundo a literatura, existem quatro tipos diferentes de células clorídricas (PERRY, 1997), que serão chamadas de I, II, III e IV (Fig. 1) para melhor compreensão dos resultados apresentados. Em cada tipo, a membrana apical da célula clorídrica tem uma aparência distinta que permite identificar de forma simples cada uma destas células a partir das células pavimentosas e mucosas circundantes. O tipo I (Fig. 1A) é caracterizado por ter a aparência da membrana apical semelhante a uma esponja devido ao raro arranjo das micrópilas da membrana plasmática. No tipo II (Fig. 1B), a membrana apical tem uma aparência semelhante a um tapete, resultante de uma matriz extremamente densa de micrópilas, isto serve para levantar a membrana apical das células acima das células pavimentosas adjacentes. O tipo III (Fig. 1C) apresenta a estrutura convexa da membrana apical variável, sendo algumas células com a superfície lisa, enquanto que outras apresentam ornamentação com micrópilas, tendo uma aparência áspera da superfície. No tipo IV (Fig. 1D), a membrana apical pode ser substancialmente rebaixada a um nível abaixo das células pavimentosas adjacentes para formar uma cripta apical, uma estrutura geralmente associada com as células clorídricas de peixes marinhos.

Jagoe e Haines (1997) utilizaram técnicas histoquímicas para estudar efeitos de água com adição de ácido e alumínio nas brânquias de salmão; observaram diferenças na distribuição, tamanho e forma das células clorídricas. Os autores sugeriram que um aumento dessas células e mudanças em sua estrutura pode ocorrer na tentativa de aumentar a captação de íons do ambiente, uma vez que o pH baixo aumenta a saída desses íons.

Portanto, por serem sensíveis a agentes toxicantes no meio aquático, os peixes vem se mostrando muito adequados para os estudos de toxicidade.

2.3. O herbicida 2,4-D

Este item foi elaborado como um artigo de revisão apresentado a seguir.

Herbicida 2,4-D e sua ação nos diferentes organismos não-alvo

Ana Claudia de Castro Marcato^a, Cleiton Pereira de Souza^a, Carmem Silvia Fontanetti^{*a}

^a UNESP, Av.24-A, nº1515, Rio Claro, São Paulo, Brasil

*autora correspondente: fontanet@rc.unesp.br

Tel: +55 (19) 3526-4139, Fax: +55 (19) 3526-4135

Resumo

O uso intensivo de agroquímicos tem crescido exponencialmente no Brasil e no mundo, em decorrência da necessidade de suprir a demanda alimentar de uma população em crescimento. Diante disso, o gerenciamento/monitoramento do uso de tais compostos caracteriza-se como uma atividade complexa e de alto custo e que se mal executada, pode comprometer os benefícios esperados e prejudicar o meio ambiente como um todo. Nesse sentido, com o intuito de explorar os dados disponíveis a respeito do uso de herbicidas no Brasil e no mundo, o presente trabalho buscou apresentar um histórico e uma revisão sobre o herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), suas propriedades químicas, mecanismo de ação e toxicidade sobre organismos não alvos.

Palavras-chave: agrotóxicos, toxicidade, mutagênese, organismos não alvos, agente laranja

1. Introdução

As fontes de poluição podem ser classificadas em pontuais e não pontuais (HOLT, 2000). Dentre as fontes pontuais podemos citar as diversas estações de tratamento de efluentes industriais, redes de esgoto doméstico, derramamentos acidentais e mineração. As emissões de fontes pontuais são mais facilmente detectadas e controladas e, geralmente, resultam em descargas diretas dos contaminantes nos corpos d'água. Ao contrário, as emissões de fontes não pontuais são de difícil controle, variam com o tempo e espaço e podem envolver rotas que resultem na deposição parcial dos contaminantes antes deles atingirem os corpos d'água. Um exemplo típico de fonte não pontual é a utilização de agrotóxicos no solo (COSTA et al., 2008).

As emissões de contaminantes no ar, no solo e principalmente, nas águas estão relacionadas aos processos naturais e, principalmente, às atividades humanas. O aumento da população mundial e a demanda crescente de alimentos têm motivado o uso de grandes

quantidades de agrotóxicos nas plantações para prevenir ou combater pragas, visando assegurar maior produtividade (CALDAS; SOUZA, 2000). As primeiras substâncias utilizadas para combater pragas ou doenças foram o enxofre, a cal e alguns sais de arsênio (SANCHES et al., 2003).

A intensificação do uso de agrotóxicos nas últimas décadas e os efeitos danosos desses agentes químicos ao homem e ao ambiente fez com que vários países regulamentassem seu uso e sua produção, com o objetivo de minimizar as consequências danosas nos ecossistemas. Para tanto, cada país instituiu comissões ou comitês multidisciplinares e organizações com características administrativas legais para avaliar o nível de periculosidade e os riscos que esses produtos impõem ao homem e ao ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os agrotóxicos são biocidas por natureza, isto é, são venenos utilizados na agricultura para exterminar uma praga agrícola. Nesse grupo muito diversificado de compostos químicos, encontram-se fungicidas, inseticidas e herbicidas considerados extremamente agressivos ao meio ambiente e à saúde humana (GRISOLIA, 2005).

Após a Segunda Guerra Mundial, o número de substâncias novas e o uso extensivo dessas na agricultura aumentaram largamente. Com o aumento do plantio de monoculturas e a destruição da diversidade, ocorreu o aparecimento de várias pragas, as quais são combatidas pelo uso de agrotóxicos (AMARANTE JR., 2002). Considerando-se que o uso de produtos agroquímicos, tais como herbicidas, causaram uma grande contaminação ambiental, devido ao seu uso generalizado, tornou-se indispensável avaliar a toxicidade destes compostos (MARIN-MORALES et al., 2013). O uso de tais compostos tem causado contaminação de sistemas aquáticos, sendo importante monitorar as águas subterrâneas, especialmente em áreas próximas a regiões agrícolas e locais que constituem fontes primárias de água potável (SANCHES et al., 2003).

Sendo assim, embora a aplicação do herbicida aumente a produtividade agrícola, ele apresenta efeitos ecológicos graves, causando toxicidade em águas receptoras e inibição de sistemas de tratamentos biológicos, mesmo em baixas concentrações (MARRÓN MONTIEL et al., 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo apresentar um histórico sobre o uso de herbicidas no Brasil e no mundo, assim como apresentar uma revisão sobre o herbicida

2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), suas propriedades químicas, mecanismo de ação e toxicidade sobre organismos não alvos.

2. Propriedades químicas e mecanismo de ação do herbicida 2,4-D

A formulação básica de 2,4-D é ácido, mas o 2,4-D é formulado como sal inorgânico, amina ou éster por meio de vários processos de fabricação, e é utilizado em muitos produtos comerciais. O 2,4-D possui a fórmula molecular $C_8H_6Cl_2O_3$ (Figura 1), peso molecular 221,04, ponto de fusão $140,5^{\circ}C$, ponto de ebulição $130^{\circ}C$ e solubilidade em água de 900 mg/litro a $25^{\circ}C$ (ácido) (KENNEPOHL; MUNRO, 2001).

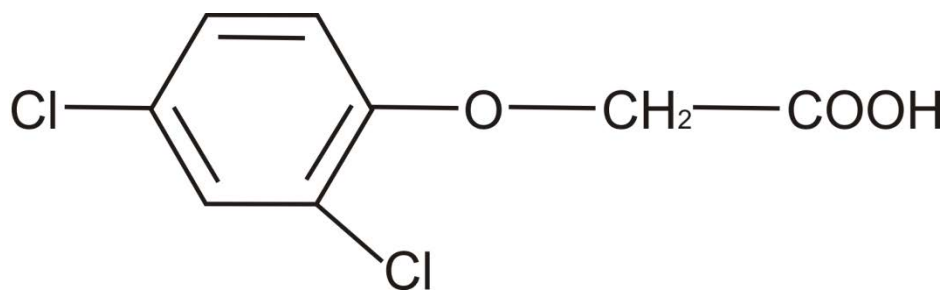


Figura 1: Estrutura química do ácido 2,4-D.

O 2,4-D contém subprodutos de síntese como as dioxinas (2,3,7,8-tetraclorodioxinas), um composto clorado muito tóxico e presente em muitas listas de produtos carcinogênicos. O grupo das dioxinas contém mais de 75 compostos, resultantes de diferentes processos industriais (GRISOLIA, 2005).

Vários derivados de ácidos clorofenoxiacéticos são classificados como reguladores do crescimento em plantas ou hormônios que atuam como auxinas sintéticas. Estes derivados são largamente utilizados como herbicidas e incluem o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (FILKOWSKI et al., 2003; KUMARI; VAIDYANATH, 1989).

O papel principal de auxinas naturais é o crescimento, mas isto não é o caso de auxinas sintéticas, também chamados herbicidas auxínicos, que desempenham a função oposta àquela de sua função biológica. Auxinas sintéticas, tais como o ácido 2,4-D persistem por longos períodos dentro da planta, e, por consequência, são mais eficazes e letais. O modo de ação de herbicidas auxínicos é dependente da dose, e o seu efeito também depende da sensibilidade dos tecidos e espécies (PAZMIÑO et al., 2012). Enquanto a concentração de auxina natural e os seus efeitos

são rigidamente controlados, os herbicidas auxínicos ultrapassam os mecanismos reguladores naturais de plantas suscetíveis e provocam uma resposta descontrolada de auxina. Em doses baixas, herbicidas auxínicos possuem propriedades hormonais semelhantes aos da auxina natural. No entanto, o crescimento das taxas causam várias anormalidades de crescimento em dicotiledôneas sensíveis (KELLEY, RIECHERS, 2007). O modo de ação do 2,4-D é por meio do aumento da plasticidade da parede celular e de aumentos anormais de biossíntese de proteínas e de etileno, resultando em uma descontrolada divisão celular e danos ao tecido vascular das plantas (USEPA, 2005). Portanto, o 2,4-D sendo quimicamente semelhante às auxinas, provoca uma superestimulação do crescimento, culminando na morte da planta alvo (ORUÇ et al., 2004; BENLI et al., 2007).

Os pesticidas clorofenoxiácidos constituem importante classe de herbicidas, apresentando normalmente um longo tempo de atividade residual em solos e águas, persistindo por vários meses devido à baixa degradação microbiológica que sofre (SANCHEZ-BRUNETE et al., 1994). O 2,4-D, sendo um membro desta classe, trata-se de um composto altamente seletivo, sistêmico e pré ou pós-emergente (TOMLIN, 1994).

Desta forma, este herbicida não é facilmente biodegradável, sendo frequentemente detectado em curso d'água (CHINGOMBE et al., 2006). É comumente utilizado para o controle de pós-emergência das ervas daninhas anuais e perenes de folhas largas em cereais, milho, pastagens, arroz, florestas e terras não agrícolas. Este composto, emitido para o meio ambiente, principalmente a partir de fontes antropogênicas é caracterizado pela alta toxicidade, persistência e capacidade de bioacumulação (MICHALOWICZ, 2005; MICHALOWICZ; DUDA, 2007; AYDIN et al., 2005).

Segundo a United States Environmental Protection Agency (USEPA), o herbicida 2,4-D foi classificado como Grupo D (não classificáveis como carcinogênico humano), em decorrência de que as evidências encontradas são inadequadas, não podendo assim, ser demonstrado o efeito carcinogênico do herbicida (KENNEPOHL; MUNRO, 2001).

3. Uso do herbicida 2,4-D no Brasil e no mundo

O 2,4-D tem sido amplamente usado em todo o mundo (WHO, 1984). Os herbicidas fenoxiácidos 2,4-D e 2,4,5-T (2,4,5-triclorofenoxiacético) são utilizados em larga escala para o

controle de ervas daninhas de folhas largas desde o início da década de 1940 (ITOH et al., 2013; GRISOLIA, 2005).

No passado, o 2,4-D foi combinado com o 2,4,5-T para o controle de ervas daninhas (WOLFE, 1984). Mais de 10 milhões de galões dessa mistura chamada de Agente Laranja, formulada com a proporção de 1:1 (MORTELMANS et al., 1984) foram utilizados na Guerra do Vietnã para desfolhar as árvores (WOLFE, 1984).

Sendo assim, embora o 2,4-D seja um dos herbicidas mais largamente utilizados com sucesso, o seu uso intensivo levou ao aparecimento de ervas daninhas resistentes, podendo dar origem a vários problemas toxicológicos, quando presente em concentrações superiores às recomendadas (TEIXEIRA et al., 2007).

As concentrações recomendadas para o uso do 2,4-D estão apresentadas na Tabela 1, que leva em consideração as culturas mais predominantes no Brasil e as ervas daninhas mais comuns nas lavouras brasileiras.

4. Toxicidade do 2,4-D em diferentes organismos

Os agrotóxicos podem ser utilizados como um bom modelo para o estudo da ecotoxicologia, pois contaminam atmosfera, água e terra, são persistentes no meio ambiente, entram nas cadeias ecológicas e provocam efeitos tóxicos adversos que atingem desde uma bactéria até o homem. A avaliação do impacto do uso de agrotóxicos sobre organismos não alvos é feita por diferentes testes. São considerados organismos representativos para estes diferentes testes, pequenos mamíferos e pássaros, microrganismos de solo, insetos polinizadores (abelhas e vespas) e organismos aquáticos (peixes, zooplâncton, fitoplâncton e microcrustáceos) (GRISOLIA, 2005).

O uso de herbicidas nos campos agrícolas acarreta problemas de saúde devido à persistência ambiental e um aumento na concentração dos agrotóxicos durante a passagem através da cadeia alimentar. O alimento é a principal via para a exposição da população humana a estes produtos químicos e, alguns tipos de peixe e marisco têm sido reconhecidos como principais vetores para a transferência destes contaminantes para os seres humanos (ATEEQ et al., 2006). O 2,4-D pode causar diversas alterações metabólicas e necrose tecidual em organismos não alvos, incluindo membros importantes da cadeia alimentar (GALLAGHER; Di GIULIO; 1991).

O 2,4-D é rapidamente absorvido através do trato gastrointestinal após exposição oral, os resíduos deste agroquímico observados em níveis plasmáticos de 10 minutos a 24 horas após a exposição, dependendo da dose e da forma química do 2,4-D (KNOPP; SCHILLER, 1992). A absorção do 2,4-D éster é relatada como mais lenta que as formas de sal e ácido (ERNE, 1966); porém, a taxa de excreção das diferentes formas químicas é similar (KNOPP; SCHILLER, 1992).

O 2,4-D, segundo Bécaert et al. (2006), apresentou um efeito negativo sobre o solo, seja por inibição direta ou por remoção de uma fonte de produção de enzima (bactérias). Este efeito inibidor resultou em perda da estabilidade funcional da urease, β -glicosidase e sulfatase indicando um impacto sobre a estabilidade do solo por meio da alteração de mecanismos funcionais de resistência e de recuperação do mesmo.

Em testes de laboratório utilizando *Eisenia foetida* (Annelidae), o 2,4-D demonstrou efeitos graves sobre o desenvolvimento e a reprodução. Os efeitos tóxicos observados após exposição dos animais em solos contaminados com 2,4-D foram muito mais severos do que os observados na exposição ao herbicida glifosato, na mesma concentração (CORREIA; MOREIRA, 2010).

Hoy (1985) realizou experimentos expondo espécimes de *Scytonotus simplex* (milípede) expostos a três diferentes doses de 2,4-D, aplicados de três maneiras ao solo (aplicado uniformemente no substrato, aplicado em metade do substrato e adicionado à metade do alimento fornecido) e a grupo controle. Durante o experimento, foi observado que até o 10º dia de experimento, não houve mortalidade no grupo controle e que nos demais grupos, a mortalidade começou nos dois primeiros dias de experimento e aumentou progressivamente durante os primeiros 10 dias. Comparações entre os três métodos de administração de 2,4-D sugerem que esta espécie de milípedes evita superfícies tratadas com 2,4-D. Este trabalho sugere que a distribuição espacial dos resíduos de 2,4-D no campo pode influenciar o efeito do herbicida neste grupo animal. Uma distribuição uniforme, contaminando uma grande porção de terra parece ser mais prejudicial do que uma distribuição irregular.

Segundo Gallagher e Di Giulio (1991), este herbicida é geralmente considerado como sendo não tóxico para os peixes em doses baixas. Entretanto, Fonseca et al. (2008) afirmaram que os resultados obtidos em suas pesquisas indicam que o 2,4-D afeta o cérebro e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) dos músculos e alguns parâmetros metabólicos do sangue e tecidos de *Leporinus obtusidens*, provavelmente devido ao estresse gerado pela toxicidade do

herbicida. Sarikaya e Yilmaz (2003) também descreveram o herbicida 2,4-D como sendo altamente tóxico para os peixes, tendo efeitos muito nocivos para os seres humanos e animais, uma vez que, se acumula nos tecidos e provoca envenenamento agudo (WHO, 1984).

Ateeq et al. (2006), utilizando análises histológicas das gônadas e o tecido hepático de peixes da espécie *Clarias batrachus* para análise da fragmentação do DNA confirmaram o efeito genotóxico do 2,4-D. Nas análises histológicas das gônadas, nos ovários o herbicida induziu a apoptose, confirmada pela presença de ovócitos atrésicos, blebbing nuclear, cariólise, hipertrofia e vacuolização, além de deformidades mitocondriais, citoplasma eletrondenso, dano da membrana plasmática, vacuolização e heterocromatinização. Nos testículos, os túbulos eram relativamente menores em tamanho e continham principalmente espermátides. Algumas células nos túbulos seminíferos mostraram necrose caracterizada por dissolução do núcleo e da membrana nuclear. Células de Leydig apresentaram hipertrofia, que pode ser uma resposta ao aumento da demanda funcional. Sendo assim, este estudo confirma o efeito genotóxico do 2,4-D.

Cattaneo et al. (2008) relataram que durante o período de exposição ao herbicida 2,4-D, os peixes da espécie *Rhamdia quelen* apresentaram algumas alterações de comportamento como letargia e natação errática. A análise histológica do fígado apresentou alterações, após o período de exposição, como arranjo anormal dos cordões hepáticos, ruptura da membrana celular e vacuolização dos hepatócitos.

Tayeb et al. (2010) utilizaram fígados de ratos para verificar a toxicidade do 2,4-D. Os animais intoxicados, pelo método de gavage, apresentaram alterações acentuadas do tecido hepático. Após quatro semanas de tratamento, os animais submetidos à 15 mg/kg de 2,4-D, apresentaram os cordões hepáticos rompidos em muitos lugares. Observaram também necrose focal, vacuolização de hepatócitos e vasodilatação. Estas alterações foram mais acentuadas após a exposição com uma dose de 75 mg/kg. A área de necrose foi especialmente mais frequente nesta concentração, além de observarem o aumento da carga de glicogênio. O tratamento de 150 mg/kg de 2,4-D apresentou outras alterações histopatológicas como núcleos picnóticos, congestão dos hepatócitos, aumento significativo das células em necrose, vacuolização de alguns hepatócitos e perda da forma poliédrica habitual. Os cordões hepáticos também estavam interrompidos em muitas áreas, concluindo que o 2,4-D provoca hepatotoxicidade subaguda.

A fim de investigar os efeitos do 2,4-D sobre a morfologia e função testicular, cabras anãs foram submetidas a três diferentes tratamentos com o herbicida. Os resultados encontrados

apresentam alterações do túbulo seminífero, tais como hiperemia e edema do estroma, e a membrana basal separada da fibromuscular circundante. Foi observada uma redução no número de células de Sertoli, sendo que as alterações vasculares do estroma intertubular foram presentes em todos os grupos tratados, caracterizando uma perda na efetividade da reprodução do animal. Sendo assim, a exposição ao ácido 2,4-D afetou negativamente os níveis de espermatozoides dos indivíduos, podendo implicar numa possível disfunção espermática para os seres humanos e outras espécies que podem sofrer exposição a esta substância tóxica ambiental quando aplicado em terrenos agrícolas (OBIDIKE et al., 2012).

Pesquisas afirmam que o 2,4-D induz aberrações cromossômicas, comprovando seu efeito genotóxico/mutagênico (KALE et al., 1995; TUKULA; JALAL, 1985; MUSTONEM et al., 1986).

Para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade, bioensaios com plantas têm sido considerados em vários casos mais apropriados, principalmente quanto a abordagem ética. Desta forma, muitos vegetais superiores são frequentemente, utilizados para o monitoramento de poluentes ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009; FONTANETTI et al., 2011; 2012). Segundo Ma et al. (1995), os vegetais, por serem receptores biológicos diretos de poluentes, constituem um importante material para testes genéticos e de monitoramento ambiental.

Crocker (1953) em estudos com bulbos de cebola relatou que o 2,4-D provoca alterações na mitose, e estas são proporcionais à concentração, podendo ser agrupadas em alterações estruturais e fisiológicas. Alterações fisiológicas tais como aderência, condensação cromossômica e atraso na formação do fuso mitótico foram vistos imediatamente após duas horas de tratamento. A alteração estrutural inclui quebra de cromátide, observada após duas ou quatro horas de exposição ao tratamento com a concentração mais alta e quebras cromossômicas foram observadas em todas as concentrações. Portanto, o 2,4-D afeta o ciclo de ácidos nucleicos, sugerindo que o efeito sobre a estrutura do cromossomo é análoga com a ação das radiações.

Pavlica et al. (1991) também testou bulbos de cebola e 2,4 D. Observou que a concentração de 45 μ M reduziu a atividade mitótica, que foi três vezes menor que o controle, já a concentração de 450 μ M estimulou a divisão celular e aumentou o número de aberrações cromossômicas. O 2,4-D teve forte efeito sobre o fuso mitótico, a maioria das anormalidades encontradas foi C-mitoses, distúrbios na anáfase e problemas na reconstituição do núcleo. O herbicida provocou alterações cromossômicas em metáfase, anáfase e telófase, exceto

micronúcleos que foram vistos principalmente em intérfase. Pontes cromossômicas em anáfase e telófase foram encontradas após 2 e 24 horas de tratamento com 450 μ M, cromossomos atrasados também foram observados, porém em baixa frequência, enquanto o tipo mais frequente de alteração foram os micronúcleos, detectados nas duas concentrações. Aderências cromossômicas foram frequentes e acompanhadas de instabilidade no fuso mitótico e nos cromossomos. Fragmentação da cromatina em núcleos interfásicos foi vista na concentração mais alta, sob forma de corpos de cromatina.

Segundo Ateeq et al. (2002), bulbos de cebola submetidos a soluções de diversas concentrações de 2,4-D apresentaram, em particular nas doses 25-100 ppm, alterações marcantes tanto sobre o crescimento geral como na forma das células, além de um índice mitótico próximo de zero. Nas doses que variavam de 5-20 ppm foram observados “Crochet hook”, C-tumores e inchaço nas raízes; por fim as raízes das dosagem que variava de 1-4 ppm foram usadas para o teste de aberrações cromossômicas, no entanto este parâmetro não foi calculado efetivamente, pois as raízes apresentavam um pequeno comprimento (3-5mm).

Estudos de genotoxicidade do 2,4-D em plantas transgênicas (*Arabidopsis thaliana*) demonstraram que o aumento da concentração do herbicida de 0-3 e 0-30 μ g/l levou ao aumento da frequência de reversões A→G quando comparadas com o grupo controle. O aumento para 100 e 300 μ g/l na concentração de 2,4-D no meio levou à diminuição na frequência de recombinação. Curiosamente, não foi observado efeito do 2,4-D na frequência de mutações T→G. O aumento na frequência de recombinação em baixas concentrações estava relacionado com o aumento dos níveis de mutações de ponto A→G. Assim, de uma forma geral, o 2,4-D teve forte efeito sobre a recombinação nas menores concentrações testadas, no entanto, esta tendência não foi observada nas concentrações mais elevadas (FILKOWSKI et al., 2003).

Estudo de toxicidade de derivados de auxinas sintéticas em plantas de folhas largas e cereais mostrou que os herbicidas fenoxiacéticos inibiram o crescimento radicular, tanto em cereais como em plantas de folhas largas, no entanto, gramíneas em geral foram menos sensíveis aos derivados de 2,4-D. Os derivados dos herbicidas mostraram-se mais tóxicos para as plantas de folhas largas do que para as gramíneas (GRABINSKA-SOTA et al., 2003).

Em estudo sobre os efeitos citogenéticos do 2,4-D em solução de 50% em água (1-2 L/ha) em *Hordeum vulgare* (cevada), observou-se que a dose mínima produziu um aumento de quase duas vezes na ocorrência de aberrações citogenéticas. Mesmo sendo este aumento significativo,

esta ocorrência não se mostrou dose dependente, pois mesmo com a duplicação na dose do herbicida, a frequência de células aberrantes pouco mudou (GERAS'KIN et al., 2005).

Kumar et al. (2010) relataram nos seus estudos com trigo que o 2,4-D reduziu o índice mitótico, sendo este parâmetro dose dependente. Na variedade HUW 468 foi observada a maior frequência de células anormais na concentração de 1200 ppm do herbicida. A indução de anormalidades cromossômicas também se mostrou dose dependente em todos os tratamentos. As aberrações cromossômicas mais comuns encontradas foram aderência e pontes, mas também foi observada multipolaridade, além de atraso cromossômico em resposta à dose máxima de herbicida em todas as variedades.

Resultados do estudo que avaliou a genotoxicidade do 2,4-D em mudas de feijão, usando os ensaios cometa e RAPD (Amplificação Randômica do DNA Polimórfico) indicaram que a GTS (Estabilidade do Modelo Genômico) e o crescimento das raízes foram reduzidos nos tratamentos em relação ao controle negativo. O aumento da proteína solúvel total foi observado nas mudas expostas ao 2,4-D, enquanto que foi reduzida quando exposta ao controle positivo. Foram observados também que os valores de danos ao DNA, no ensaio do cometa, foram substancialmente mais elevados do que os controles negativos, em todos os grupos de tratamento. Os padrões de RAPD também apresentaram diferenças significativas entre o controle negativo e as mudas tratadas, como desaparecimento de uma banda normal e/ou aparecimento de uma banda adicional. Em resumo, o número de bandas aumentou com o aumento da concentração do herbicida auxínico, mostrando assim um efeito dose-dependente (CENKCI et al., 2010).

5. Considerações finais

Diante do exposto, conclui-se que o herbicida 2,4-D é efetivo quando utilizado em plantas de folhas largas, porém, é prejudicial quando presente nos ecossistemas aquáticos e terrestres, podemos assim inferir que mesmo em doses baixas, esse agrotóxico possui ação citotóxica, genotóxica e mutagênica para as plantas que entraram em contato com essa substância, e alterações histológicas, fisiológicas e comportamentais nos diferentes animais expostos a ela.

5. Referências

- AMARANTE JR., O.P. **Avaliação do potencial de contaminação por herbicidas: determinação do 2,4-D e do seu principal produto de degradação em solos de campos de cultivo de eucaliptos.** 2002. p. 12. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2002.
- ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; ALI, M. N.; AHMAD, WASEEM. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105–113, 2002.
- ATEEQ B., FARAH M. A., AHMAD W. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies, **Life Sciences** v.78 p. 977 – 986, 2006.
- AYDIN, H., ÖZDEMİR, N., UZUNÖREN, N. Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat kidneys. **Forensic Science International**, v. 153, p. 53–57, 2005.
- BÉCAERT, V.; SAMSON, R.; DESCHÊNES, L. Effect of 2,4-D contamination on soil functional stability evaluated using the relative soil stability index (RSSI). **Chemosphere**, v. 64, p. 1713–1721, 2006.
- BENLI, A. Ç. K.; SARAKAYA, RABIA.; SEPICI-DINCEL, A.; SELVI, M.; SAHIN, D.; ERKOÇ, F.. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823) **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 296–299, 2007.
- CALDAS, E.; SOUZA, L. C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n. 5, p. 529-537, 2000.
- CATTANEO, R., LORO, V. L., SPANEVELLO, R., SILVEIRA, F.A., LUZ, L., MIRON, D.S., FONSECA, M.B., MORAES, B.S., CLASEN, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.92, p.133–137, 2008.
- CENKCI, S.; YILDIZ, M.; CIGERCI, I. H.; BOZDAG, A.; TERZI, H.; TERZI, E. S. A. Evaluation of 2,4-D and dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1558 –1564, 2010.
- CHINGOMBE, P., SAHA, B., WAKEMAN, R. J. Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benazolin from water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, p. 44-442, 2006.
- CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C. Effects of Glyphosate and 2,4-D on Earthworms (*Eisenia foetida*) in Laboratory Tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v, 85, p.264–268, 2010.

COSTA, C. R., OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, nº7, p.1820-1830, 2008.

CROKER, B.H. Effects of 2,4-D Dichlorophenoacetic acid and 2,4,5- Trichlorophenoxyacetic acid on mitosis in *Allium cepa*. **Botanical Gazette**, v. 114, p. 274-283, 1953.

FILKOWSKI, J.; BESPLUG, J.; BURKE, P.; KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O. Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers. **Mutation Research**, v.542, p.23–32, 2003.

FONSECA, M. B.; GLUSCZAK, L.; MORAES, B. S.; MENEZES, C. C.; PRETTO, A.; TIerno, M. A.; ZANELLA, R.; GONÇALVES, F. F.; LORO, V. L. The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 416–420, 2008.

FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T.S.; CHRISTOFOLETTI, C.A. The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In: Bilibio, C.; Hensel, O.; Selbach, J. (Org.). **Sustainable water management in the tropics and subtropics - and cases study in Brazil**. Brasil/Alemanha: UNIPAMPA/UNIKASSEL, 2012, v. 3, p. 975-1005.

FONTANETTI, C.S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIERO, G. Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. In: Simone Pascucci. (Org.). **Soil Contamination**. 1ªed.Rijeka, Croácia: InTech, 2011, v. , p. 143-168.

GALLAGHER, E., DI GIULIO, R. Effects of 2,4-D dichlophenoxyacetic acid and picloran on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Toxicology Letters**, v. 57, p. 65–72, 1991.

GERAS'KIN, S. A.; KIM, J. K.; DIKAREV, V. G.; OUDALOVA, A. A.; DIKAREVA, N. S.; SPIRIN Y. V. Cytogenetic effects of combined radioactive (¹³⁷Cs) and chemical(Cd, Pb, and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalar meristem cells. **Mutation Research**, v. 586, p. 147–159, 2005.

GRABINSKA-SOTAA, E.; WISNIEWSKA, E.; KALKA, J. Toxicity of selected synthetic auxines—2,4-D and MCPA derivatives to broad-leaved and cereal plants. **Crop Protection**, v, 22, p. 355–360, 2003.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 392p, 2005.

HOLT, M. S. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. **Food Chem. Toxicol.**, 38, S21, 2000.

HOY, J. B. Toxicity of 2,4-D to Millipeds (Polydesmidae: Diplopoda): Food Contamination and Residue Distribution as Factors. J. Econ. Entomol. **Journal of Economic Entomology**, v. 78, p. 302-304, 1985.

ITOH, K.; KINOSHITA, M.; MORISHITA S.; CHIDA M.; SUYAMA K. Characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-degrading fungi in Vietnamese soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, p. 124–132, 2013.

KALE, P.G.; PETTY, B.T.; WALKER, S.; FORD, J.B.; DEHKORDI, N.; TARASIA, S.; TASIE, B.O.; KALE, R.; SOHNI, Y.R. Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, p. 148-153, 1995.

KELLEY, K. B.; RIECHERS, D. E. Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v, 89, p. 1–11, 2007.

KENNEPOHL, E.; MUNRO, I. C. Phenoxy Herbicides (2,4- D). In: Krieger, R. I.; Krieger W. C. **Handbook of Pesticide Toxicology**, Second Edition, San Diego, CA. Academic Press.v.2, p.1623-1638, 2001.

KNOPP, D.; SCHILLER, F. Oral and dermal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid sodium and dimethylamine salts to male rats: Investigations on absorption and excretion as well as induction of hepatic mixed-function oxidase activities . **Archives of Toxicology**, v. 66, p. 170 – 174, 1992.

KUMAR, S.; ARYA, S. K.; ROY, B. K.; SINGH, A. K. he effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and isoproturon herbicides on the mitotic activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) root tips. **Tsitologiia I Genetika** , p. 14-21, 2010.

KUMARI, T. S.; VAIDYANATH, K. Testing of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) using multiple genetic assay systems of plants. **Mutation Research**, v.226, p. 235-238, 1989.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p.71–81, 2009.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; Mc CONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v.334, p.185-195, 1995.

MARIN-MORALES M., VENTURA-CAMARGO B. C., HOSHINA, M. M. Toxicity of Herbicides: Impact on Aquatic and Soil Biota and Human Health, Herbicides - Current Research and Case Studies in Use, Dr. Andrew Price (Ed.), ISBN: 978-953-51-1112-2, InTech, DOI: 10.5772/55851. 2013. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-current-research-and-case-studies-in-use/toxicity-of-herbicides-impact-on-aquatic-and-soil-biota-and-human-health>

MARRÓN MONTIEL, E., ORDAZ, R.; N., GRANADOS, R.; C., JUÁREZ RAMÍREZ, C., GALÍNDEZ MAYER, C.J. 2,4-D Degrading bacterial consortium. Isolation, kinetic

characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmentating an activated sludge microbial community. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1521-1528, 2006.

MICHAŁOWICZ, J. The occurrence of chlorophenols, chlorocatechols and chlorinated methoxyphenols in drinking water of the largest cities in Poland. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 14, p. 327–333, 2005.

MICHAŁOWICZ, J., DUDA, W. Phenols – the sources and toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 16, p.78–92, 2007.

MORTELMANS, K.; HAWORTH,S.; SPECK, W.; ZEIGER, E. Mutagenicity testing of agent orange components and related chemicals. **Toxicology and applied pharmacology**, v.75, p. 137-146, 1984.

MUSTONEM, R.; KANGAS, J.; VUOJOLAHTI, P.; LINNAINMMA, K. Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations *in vitro* and *in vivo*. **Mutagenesis**, v. 16, p. 37-48, 1986.

OBIDIKE I. R., AKA L. O., OMOJA V. U., SHOYINKA S. V. O., KAMALU T., NANIKA. S. M. Testicular morphology and antispermatogenic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in male West African Dwarf (WAD) goats. **Comparative Clinical Pathology**, v.21, p.1457–1462, 2012.

ORUÇ, E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v, 137, p. 43–51, 2004.

PAVLICA, M.; PAPES, D.; NAGY, B. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 263, p. 77-81, 1991.

PAZMIÑO, D. M.; ROMERO-PUERTAS M. C.; SANDALIO L. M. Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. **Plant Signaling Behavior**, v. 7, p. 425–427, 2012.

SANCHES , S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E.M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 53-58, jan./dez 2003.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; GARCIA-VALCARCEL, A. I.; TADEO, J. L. Determination of residues of phenoxi acid herbicides in soil and cereals by gas chromatography-ion trap detection. **Journal of Chromatography**, v. 675, n. 1-2, p. 213- 218, 1994.

SARIKAYA, R.; YILMAZ, M. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae)/ **Chemosphere**, v. 52, p. 195–201, 2003.

TAYEB W., NAKBI A., TRABELSI M., ATTIA N., MILED A., HAMMAMI M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde” **Journal of Hazardous Materials**, v.180 p.225–233, 2010.

TEIXEIRA, M. C., DUQUE, P., SÁ-CORREIA, I. Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. **Biotechnology**, v.25, p. 363–370, 2007.

TOMLIN, C. (Ed.). **The pesticide manual: incorporating the agrochemicals handbook**. 10th ed. Cambridge: British Crop Protection Council, the Royal Society of Chemistry, 1994. 1341p.

TUKULA, T.E.; JALAL, S.M. Increase rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicide 2,4-D. **Journal of Heredity**, v, 76, p. 213-214, 1985.

United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005. Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. EPA 738-R-05-002. June 2005.

WOLFE, W. H. The Epidemiology and Toxicology of Agent Orange. In Proceedings of the 14th Conference on Environmental Toxicology, Dayton, OH. 1984.

WHO (World Health Organization), Switzerland. Environmental Health Criteria 29: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D), 1984.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2006. 478p.

Tabela 1: Dosagem de 2,4-D utilizada nas culturas brasileiras para o controle de plantas daninhas.

Cultura	Dose de 2,4-D (Kg/ha)	Plantas alvo
Trigo	0,67 - 1,005	<i>Bidens pilosa</i>
		<i>Raphanus raphanistrum</i>
		<i>Euphorbia heterophylla</i>
		<i>Galinsonga parviflora</i>
Milho	1,005	<i>B. pilosa</i>
		<i>E. heterophylla</i>
		<i>Sida rhombifolia</i>
		<i>Commelina benghalensis</i>
		<i>Ipomoea grandifolia</i>
		<i>Alternanthera tenella</i>
		<i>Amaranthus deflexus</i>
Soja	0,67 - 1,005	<i>B. pilosa</i>
		<i>E. heterophylla</i>
		<i>S. rhombifolia</i>
		<i>C. benghalensis</i>
		<i>Ipomoea purpúrea</i>
		<i>Richardia brasiliensis</i>
Arroz	0,67 - 1,005	<i>S. rhombifolia</i>
		<i>B. pilosa</i>
		<i>C. benghalensis</i>
		<i>E. heterophylla</i>
Arroz irrigado	0,201	<i>Aeschynomene rudis</i>
		<i>Ipomoea aristolochiaefolia</i>
		<i>Aeschynomene denticulata</i>
Cana-de-açúcar	0,67 - 2,345	<i>B. pilosa</i>
		<i>S. rhombifolia</i>
		<i>Amaranthus viridis</i>
		<i>Portulaca oleracea</i>
		<i>G. parviflora</i>
		<i>Emilia sonchifolia</i>
		<i>R. brasiliensis</i>
		<i>E. heterophylla</i>
		<i>I. grandifolia</i>
		<i>Commelia bengalensis</i>
Pastagem	0,97 - 1,34	<i>Cyperus rotundus</i>
		<i>Sida cordifolia</i>
		<i>S. rhombifolia</i>
		<i>A. deflexus</i>
		<i>P. oleracea</i>

Tabela adaptada da orientação do fabricante do DMA 806 BR, Dow AgroSciences.

3. OBJETIVOS

Este projeto teve por finalidade auxiliar na avaliação dos impactos provocados pela presença e retirada do composto 2,4-D sobre a vida aquática, utilizando tilápias expostas a diferentes concentrações deste ácido. A análise foi realizada sob três óticas diferentes:

- a) para observações de alteração na superfície das células pavimentosas das brânquias foi utilizada a ultramorfologia;
- b) para a análise de possíveis alterações teciduais foi utilizada a histologia;
- c) para avaliar as células mucosas e células clorídricas foram utilizados testes histoquímicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Foram utilizados espécimes juvenis de *O. niloticus*, com peso médio de 35 g e tamanho médio de 7 cm, provenientes de piscicultura. Esses animais foram aclimatados em tanques com sistema de filtração e aeração adequada, por no mínimo 15 dias e alimentados durante todo período. Um dia antes do início do bioensaio, a alimentação dos animais foi suspensa para evitar o acúmulo de dejetos nos aquários do experimento.

4.2. Produto testado

Neste estudo foi utilizado DMA 806 BR (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), da empresa Dow AgroSciences, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sob nº 02108604.

4.3. Bioensaio

Para a montagem dos bioensaios este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP – Rio Claro, SP (CEUA – IB – UNESP – CRC) e obteve aprovação com o protocolo nº 6541, CEUA nº 028/2011 de 26.08.2011.

Baseado na informação fornecida pelo fabricante, as concentrações utilizadas para a exposição ao herbicida foram 50% da CL50, ou seja, 500 mg/L de 2,4-D, e 25% da CL50, ou seja, 250 mg/L de 2,4-D. De acordo com os dados do fabricante, a concentração letal para 50% dos peixes expostos (CL50) é aproximadamente 1000 mg/L de 2,4-D comercial; estes dados não especificam a espécie do peixe testada.

Após a aclimação, 45 tilápias foram divididas em três grupos de 15 indivíduos e cada grupo foi transferido para aquários de prova estática. O grupo controle (0 mg/l de 2,4-D) foi mantido em água limpa de poço artesiano, sem a adição de nenhum composto; o tratamento 1 foi mantido em água contaminada por 250 mg/L; o tratamento 2 foi mantido em água contendo 2,4-D comercial na concentração de 500 mg/L de 2,4-D comercial. O tempo de exposição dos animais ao referido composto foi de 96 horas, a fim de se obter a resposta aguda. Os animais permaneceram em local sem iluminação para que fosse evitada a possível fotodegradação do composto. Após este período, cinco espécimes de cada grupo foram anestesiados com benzocaína (0,1 g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e eutanasiados para a retirada do segundo arco branquial.

Para testar a recuperação desses animais, após cessar a exposição, foram adotados dois períodos: quatro e oito dias. Durante o período de recuperação simulou-se o ambiente de

aclimatação. Sendo assim, 10 indivíduos restantes de cada grupo foram transferidos para aquários independentes contendo água de poço artesiano, com iluminação natural e, alimentados normalmente, com alimento comercial contendo 36% de proteína. Os alimentos em excesso ou não consumidos imediatamente foram retirados do aquário. A transferência dos peixes para os aquários de recuperação se deu pela aclimatação destes para que não houvesse nenhum choque ou estresse adicional que pudesse interferir no experimento.

Após o primeiro período de recuperação, cinco indivíduos de cada tratamento foram coletados para avaliação da morfologia branquial. Depois do primeiro período de recuperação, 25% da água dos aquários foram trocadas para que não houvesse acúmulo de substâncias excretadas pelos próprios peixes. Os cinco indivíduos restantes de cada grupo foram eutanasiados ao final do segundo período de recuperação.

4.4. Ultramorfologia – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise da superfície das brânquias, o segundo arco branquial foi fixado em fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), mantido em geladeira. O material foi desidratado em uma série de concentrações crescentes de acetona (50%, 75%, 90%, 95%, 100%), levado ao ponto crítico e colado em suporte metálico. Foi então analisado ao microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo HITACHI TM3000 e fotografado.

4.5. Histologia das brânquias

Para estudo da morfologia das brânquias, o material foi fixado em solução Bouin (15 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 5 mL de formaldeído e 1 mL ácido acético), durante aproximadamente 24 horas. Em seguida, o material foi mergulhado em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantido em geladeira; após a estabilização, o material foi desidratado em série alcoólica por 20 minutos cada concentração (15%, 25%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), colocados em resina de embebição por no mínimo 24 horas e, finalmente, incluído em resina contendo catalisador. Após polimerização, os blocos foram seccionados com espessura de até 6 µm, com auxílio de micrótomo. Os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas.

Após secagem das lâminas em estufa, os cortes foram hidratados por 1 minuto em água destilada, corados com hematoxilina de Harris por 8 minutos e após isso, reagiram com água de torneira por 4 minutos. Depois destas etapas, eles foram lavados em água corrente, corados com eosina por 5 minutos e, novamente, lavados em água corrente. Depois de secas, as lâminas foram montadas com resina sintética. As mesmas foram analisadas em

microscópio de luz e as imagens foram fotodocumentados em fotomicroscópio, fazendo-se uso do programa para captura de imagens – Leica LAS v. 3.6.

4.6. Histoquímica

Cálcio – Método de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) -

Para a observação de células clorídricas, foi utilizada a proposta de Pereira e Caetano (2009); o material fixado em paraformaldeído 4% foi processado seguindo a rotina histológica e os cortes foram imersos em nitrato de prata por 20 minutos, lavados em água e transferidos para hidroquinona ou revelador fotográfico; foram imersos em tiosulfato de sódio ou fixador fotográfico F-5 (Kodak) por 5 minutos e contracolorados com hematoxilina; a montagem das lâminas foi feita com gelatina glicerizada.

Polissacarídeos neutros – Técnica do PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

Para observação de células mucosas, o material fixado em solução Bouin (15 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 5 mL de formaldeído e 1 mL ácido acético) foi processado seguindo a rotina histológica e os cortes do material foram oxidados por 10 minutos em solução de ácido periódico 0,4% e colocados no reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; foram deixados em água sulfurosa por 3 minutos e finalmente lavados em água corrente por 30 minutos. A montagem das lâminas foi realizada com resina sintética.

4.7. Análise e Documentação dos Resultados

A análise histológica dos materiais foi realizada em microscópio de luz nas objetivas de 10, 40 e 100x. Foram analisadas duas lâminas com oito cortes de 6 µm para cada peixe, sendo n = 15 para cada tratamento do bioensaio. Desta forma, foram analisados um total de 90 lâminas e 720 cortes histológicos por técnica realizada.

Os resultados encontrados no controle e nos tratamentos foram comparados entre si pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis. A descrição e a avaliação das alterações histopatológicas tiveram como base o protocolo de Bernet et al. (1999). Este foi adaptado pelo grupo de pesquisa da professora Carmem S. Fontanetti Christofolletti para a análise semiquantitativa das principais alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de tilápias expostas à contaminantes.

Um fator de importância (w) foi definido para cada lesão, de acordo com sua importância patológica, ou seja, como isso afeta a função do órgão e a capacidade de

sobrevivência dos peixes. As alterações foram previamente classificadas em três fatores de importância: (1) Importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível quando a exposição ao estressor termina; (2) Importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos, quando o estressor é neutralizado; e (3) Importância patológica acentuada, a lesão é geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão.

Foi desenvolvida, então, uma tabela própria para o presente estudo (Tabela 1), com as principais alterações encontradas nas brânquias dos peixes expostos ao herbicida 2,4-D. Para melhor compreensão dos resultados, as anomalias histopatológicas descritas, também foram classificadas em escores (a) que variam de 0 a 6, dependendo do grau e da extensão da alteração, sendo: (0) nenhuma ocorrência; (2) pouca ou rara ocorrência; (4) ocorrência frequente; e (6) ocorrência muito frequente. Além disso, valores intermediários (1, 3, 5) também foram considerados quando a alteração observada não era presente em todos indivíduos analisados.

Tabela 1: Valores de fator de importância atribuídos as diferentes alterações observadas nas brânquias *O. niloticus* expostos ao 2,4-D

Alteração	Fator de importância (w)
Desprendimento do epitélio lamelar	1
Hipertrofia das células pavimentosas	1
Aumento no número de células mucosas	1
Aumento no número de célula clorídrica	1

Ao multiplicar o fator de importância pelo escore, obteve-se o índice da alteração. Para o cálculo do índice total de cada indivíduo, ou seja, o índice correspondente à avaliação das alterações histopatológicas em sua brânquia, foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\text{Índice}_{\text{ind}} = \sum (\text{fator de importância} \times \text{escore})$$

A partir dos índices individuais foram obtidos os valores de média e desvio padrão para cada grupo – controle e tratamentos – os quais foram avaliados estatisticamente por meio do teste Kruskal-Wallis em níveis de 5% de significância para comparação de cada tratamento com o grupo controle. Este procedimento foi realizado para avaliar estatisticamente o conjunto de lesões branquiais. Assim, este método padronizado de avaliação permite a análise semiquantitativa de danos aos órgãos, incluindo a extensão, a significância e a importância patológica das alterações.

As células mucosas, evidenciadas pela técnica histoquímica de PAS, foram avaliadas segundo o protocolo de Biagini et al. (2009), em que três cortes histológicos, com três lamelas principais íntegras, de cada indivíduo, foram selecionadas para a contagem das células mucosas. Dessas lamelas principais foram contadas as células mucosas de 30 regiões interlamelares de todos os indivíduos dos quatro tratamentos.

Para a contagem das células clorídricas presentes no epitélio branquial foi adaptado o protocolo utilizado por Biagini et al. (2009) para células mucosas. As células clorídricas foram contabilizadas ignorando-se os tipos, englobando todas apenas na categoria de célula clorídrica. A contagem foi realizada sob microscópio eletrônico de varredura; foram analisadas 30 regiões interlamelares, de três lamelas diferentes de cada peixe.

Aos resultados obtidos com a contagem das células mucosas e clorídricas foram atribuídos valores de fator de impacto. Ao aumento no número destas células, foi atribuído um escore. Os cálculos do índice de alteração foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis, assim como as outras alterações encontradas.

5. RESULTADOS

5.1. Análise da superfície branquial

O grupo controle, tanto da exposição quanto das recuperações, apresentaram células pavimentosas com ausência das cristas centrais em algumas regiões das lamelas (Figuras 2A, D, G).

A análise ultramorfológica das brânquias dos indivíduos submetidos à todas as concentrações do herbicida 2,4-D revelou o mesmo padrão das cristas das células pavimentosas do grupo controle. Os animais do tratamento 1 apresentaram hipertrofia das células pavimentosas em todas as lamelas secundárias (Figura 2B), enquanto que os animais do tratamento 2 apresentaram esta alteração em pontos isolados (Figura 2C).

Os animais do grupo controle do bioensaio de exposição apresentaram células clorídricas dos tipos I, III e IV, sendo encontrada em maior quantidade células do tipo IV. Os animais expostos ao herbicida apresentaram diferentes tipos de células clorídricas, além de apresentarem um aumento dessas células quando comparados aos animais do controle, como pode ser observado na tabela 2. Os animais do tratamento 1 apresentaram células clorídricas do tipo I, II, III e IV, sendo a célula do tipo II encontrada em maior quantidade. Os animais do tratamento 2 apresentaram os tipos celulares II, III e IV, com maior quantidade de células do tipo II.

Após o período de 96 horas de recuperação, os animais do grupo controle apresentaram células clorídricas dos tipos I e IV. Os animais do tratamento 1 apresentaram regressão nas alterações apresentadas durante a exposição (Figura 2E). A hipertrofia regrediu e as células clorídricas presentes eram de dois tipos (III e IV). Os animais do tratamento 2 também apresentaram regressão nos pontos isolados de hipertrofia das células pavimentosas e apresentaram dois tipos de células clorídricas (II e IV) (Figura 2F). Os animais do grupo controle apresentaram um aumento no número de células observadas, enquanto que os animais expostos apresentaram uma redução no número total dessas células, como pode ser observado na tabela 3. Os animais submetidos ao primeiro período de recuperação apresentaram diferenças na distribuição dos tipos celulares encontrados quando comparados aos animais que foram eutanasiados após o período de 96 horas de exposição.

Os animais do grupo controle após o período de 192 horas de recuperação apresentaram células clorídricas dos tipos III e IV e os animais do tratamento 1 apresentaram células do tipo I,

III e IV. Não foi possível observar as células clorídricas nos animais do tratamento 2, pois as brânquias apresentaram uma camada de muco recobrindo a maior parte das lamelas. Apesar de ter sido possível a observação das células clorídricas nos animais do grupo controle e do tratamento 1, a presença do muco impediu a contabilização dessas células pelo método proposto.

Os animais submetidos ao período de 192 horas de recuperação, de todos os tratamentos, apresentaram regressão total das alterações observadas após a exposição (Figura 2G, H), sendo semelhantes ao controle, porém apresentaram uma camada de muco recobrindo a maior parte das lamelas (Figura 2I).

Para melhor visualização dos diferentes tipos de células clorídricas nos diferentes tratamentos e período de exposição e de recuperações, foi elaborada uma tabela (tabela 4).

5.2. Análise histológica das brânquias

A análise histológica das brânquias do grupo controle apresentou o padrão branquial descrito por Fanta et al. (2002) para peixes teleósteos (Figs. 3A, B). Os animais observados apresentaram arcos branquiais formados por filamentos primários (lamelas primárias), tendo cada filamento primário lamelas respiratórias (lamelas secundárias) alinhadas ao longo de seus dois lados. Os filamentos primários são cobertos por epitélio pavimentoso estratificado. As lamelas secundárias possuem espaços de sangue limitados por células pilares, separada do epitélio por uma grossa membrana basal. Hemácias elípticas e nucleadas são vistas dentro do espaço do sangue nas lamelas secundárias.

Todos os animais dos tratamentos apresentaram alterações morfológicas nas lamelas secundárias. As alterações mais frequentemente observadas foram o desprendimento epitelial nestas lamelas (Figs. 3C, D, E, F) e a hipertrofia celular das células pavimentosas (Figs. 3C, D). A frequência foi inversamente proporcional ao aumento das concentrações do herbicida, diluído em água. Por entre as células hipertrofiadas foram observadas células clorídricas (Figs. 3C, D).

Nos animais expostos a menor concentração utilizada (tratamento 1), todos os indivíduos apresentaram as alterações em quase toda a extensão das brânquias, já os animais expostos a maior concentração utilizada (tratamento 2) apresentaram as alterações apenas em regiões isoladas do material analisado.

Os animais do grupo controle após ambos os períodos de recuperação, 96 e 192 horas, mantiveram o padrão normal descrito para as brânquias. Os animais do tratamento 1, após

período de 96 horas de recuperação, apresentaram desprendimento epitelial (Figs. 4A, B) em regiões isoladas do epitélio branquial; a hipertrofia celular regrediu totalmente após este período. Os indivíduos do tratamento 2 apresentaram regressão das alterações observadas após a exposição ao herbicida (Figs. 4C, D). Durante o primeiro período de recuperação, 96 horas, dois indivíduos do grupo 2 morreram entre 24 e 48 horas.

Os animais dos tratamentos 1 e 2, submetidos à recuperação por 192 horas, apresentaram regressão total de todas as alterações, apresentando o epitélio padrão descrito para a espécie (Figs. 5A, B, C, D).

Na análise realizada para a observação de células clorídricas em corte histológico, tanto o grupo controle quanto os tratamentos não apresentaram resposta positiva à técnica de detecção de cálcio, não evidenciando, portanto, a presença de células clorídricas com esta técnica.

Com a análise das células mucosas evidenciadas pelo PAS pode-se verificar que o número dessas células aumentou nos grupos expostos, quando comparadas ao número observado no controle (tabela 5). O tratamento 2 foi o que apresentou o maior número de células mucosas. Os animais expostos após os períodos de recuperação apresentaram redução no número de células mucosas. No primeiro período de recuperação (96 horas), a quantidade de células mucosas do grupo controle permaneceu constante, enquanto que os animais dos tratamentos 1 e 2 apresentaram redução destas células (tabela 6). Após o segundo período de recuperação (192 horas) todos os animais, de todos os grupos, tiveram redução no número de células mucosas (tabela 7). Esta redução pode ser visualizada na figura 6.

O resultado da análise estatística (tabela 8) dos dados dos animais expostos revelou que o desprendimento epitelial e a hipertrofia celular causados pela exposição a 250 mg/L de 2,4-D foi significativo quando comparado ao controle, enquanto que os resultados dos animais da exposição a 500 mg/L de 2,4-D não foram significativos para nenhuma das alterações. Os dados obtidos após o primeiro período de recuperação foram comparados entre o controle e os tratamentos, porém os valores não foram estatisticamente significativos entre eles. Comparando-se a exposição com os períodos de recuperação, o desprendimento epitelial apresentou uma regressão estatisticamente significativa no tratamento 2 após as 192 horas de recuperação. A regressão da hipertrofia celular se apresentou significativa para ambos os tratamentos e em ambos os períodos de recuperação.

O aumento do número das células mucosas não foi estatisticamente significativo quando comparados o grupo controle e os tratamentos logo após a exposição; o mesmo resultado foi obtido comparando os animais expostos com o da primeira recuperação; porém, quando comparados os valores dos animais expostos com os animais da segunda recuperação, a diminuição do número das células mucosas foi estatisticamente significativo, o que nos permite concluir que a recuperação efetiva dos animais só acontece após 192 horas (tabela 8).

O aumento das células clorídricas foi estatisticamente significativo apenas quando comparados os valores do grupo controle com o do tratamento 1, indicando que a menor concentração utilizada foi a mais prejudicial (tabela 8). A comparação entre os valores da exposição com os das recuperações não se mostraram significativos, o que pode indicar que para essa alteração seja necessário um maior período de recuperação.

6. DISCUSSÃO

A forma básica do 2,4-D é um ácido, mas é frequentemente formulado como um sal inorgânico, amina ou éster, e são usados em muitos produtos comerciais (KENNEPOHL; MUNRO, 2001). De acordo com Benli et al. (2007) algumas formulações são extremamente tóxicas para peixes, enquanto que outras, menos. Este herbicida é frequentemente detectado em curso d'água por não ser facilmente biodegradável (CHINGOMBE et al., 2006).

A contaminação ambiental por agrotóxicos pode causar alterações fisiológicas e comportamentais em peixes (ORUÇ; UNER, 1999; BRETAUD et al., 2000). Segundo alguns autores (KALE et al., 1995; TUKULA; JALAL, 1985; MUSTONEM et al., 1986), o 2,4-D induz as aberrações cromossômicas, comprovando seu efeito mutagênico. Sulik et al. (1998), observaram que ratos recém-nascidos de fêmeas que receberam doses de 2,4-D durante a gestação apresentavam alterações histológicas e histoquímicas no fígado.

Outros estudos mostraram diferentes alterações histológicas em peixes e outros animais após a exposição a agroquímicos; alguns autores sugerem que as alterações podem resultar em mau funcionamento de vários sistemas ou órgãos de peixes (ATEEQ et al., 2006; BENLI et al., 2007; CATTANEO et al., 2008).

As brânquias são o primeiro alvo de poluentes, devido ao contato constante com o ambiente externo (SALAZAR-LUGO et al., 2011). Evans (1987) propôs que as histopatologias ocasionadas por exposição a uma variedade de poluentes são sintomas secundários à interação da toxina com as várias etapas de transporte específico ou com os receptores ligados a membrana. Assim, como as vias e os receptores similares são comuns para uma variedade de tecidos humanos, que são afetadas por poluentes, as brânquias dos peixes se apresentam como um modelo de sistema que pode ser usado para investigar mais cuidadosamente essas patologias epiteliais produzidas por substâncias tóxicas. Desta forma, sabe-se apenas que a exposição ao poluente causa alteração no tecido, e que a retirada deste poluente do ambiente pode fazer com que as alterações regredam (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).

Kubrak, et al. (2013) observou que a presença do herbicida 2,4-D causa alterações nos parâmetros sanguíneos dos peixes da espécie *Carassius auratus* e que a retirada do herbicida resulta numa excelente recuperação dos parâmetros analisados. Assim como foi observado nos resultados obtidos no presente estudo, a retirada do herbicida fez com que as alterações encontradas regredissem até a recuperação total do tecido/órgão lesionado.

A ausência parcial de cristas observadas nos animais utilizados no experimento deve-se a um agente estressor e não deve ser relacionado ao poluente em que foram expostos, uma vez que, os animais do grupo controle também apresentaram essa característica. As células pavimentosas constituem a maior parte da superfície branquial; são caracterizadas por serem constituídas por cristas em suas superfícies, as quais, segundo Mallat (1985), são importantes na retenção de muco no epitélio branquial, como uma forma de proteção contra alterações ambientais. Segundo diversos autores, como Biagini et al. (2009), Mazon et al. (2002) e Wong e Wong (1999), a redução na quantidade dessas cristas pode indicar uma resposta do peixe a um poluente, ou a um agente estressor; essa redução diminui a superfície de contato com água e consequentemente, com o poluente.

Bernet et al. (1999) propuseram um protocolo como ferramenta de avaliação histopatológica em peixes. Neste protocolo, os autores dividiram as alterações em cinco grupos: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e neoplasia. O tecido branquial apresenta dois tipos de resposta celular, a de defesa e a compensatória (MALLAT, 1985; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Ambas as respostas ajudam a barrar a entrada de substâncias tóxicas, impedindo que essas substâncias alcancem a corrente sanguínea e, em menor proporção, auxiliam na prevenção dos danos causados pela exposição direta (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).

O desprendimento epitelial, observado neste trabalho, nas brânquias dos peixes submetidos a diferentes concentrações do herbicida 2,4-D, é uma alteração regressiva, cuja finalidade é reduzir funcionalmente o órgão atingido, e desta forma, diminuir a exposição do animal pela substância tóxica. Esta alteração foi descrita por diversos autores, em diferentes espécies submetidas a diversos poluentes; Randi et al. (1996) observaram em peixes sob influência do cádmio, Arellano et al. (1999), na espécie *Solea senegalensis*, exposta ao cobre, e Biagini et al. (2009) em peixes criados em águas poluídas tratadas por flotação. Nos animais expostos ao herbicida 2,4-D, foi observado que após o período de recuperação de 192 horas, a alteração regrediu totalmente, fazendo com que o órgão afetado recuperasse seu funcionamento.

A hipertrofia das células pavimentosas do epitélio, tal como a observada no presente estudo e no peixe *Prochilodus scrofa* (MAZON et al., 2002), pode atuar como uma barreira à difusão do agente tóxico, pois aumenta a distância de difusão entre a água e o sangue para a troca gasosa; assim a distância entre as lamelas e consequentemente da superfície respiratória lamelar

foi reduzida, tal alteração pode prejudicar a absorção de oxigênio a partir da água do ambiente e resultar em uma condição de hipóxia (MAZON et al., 2002), o que pode justificar a morte dos peixes que foram expostos à 250mg/L de 2,4-D durante o primeiro período de recuperação. Segundo Bernet et al. (1999), a hipertrofia é uma alteração progressiva cujo aumento do volume da célula, e não o aumento de número celular, culmina no aumento da atividade celular. Após os períodos de recuperação observou-se a regressão desta alteração, reafirmando que a retirada desse agente estressor culmina no restabelecimento da função do órgão atingido.

As alterações histológicas observadas nos animais após o período de exposição evidenciaram que o efeito do herbicida não é dose-dependente. Geras'Kin et al. (2005) relataram que as aberrações cromossômicas observadas em *Hordeum vulgare* (cevada) expostas ao herbicida 2,4-D não foram dose-dependentes, pois estas alterações são principalmente determinadas, não pelo nível de exposição, mas sim pelas características específicas do sistema biológico, que muitas vezes não é linear. Deste modo, a exposição combinada a diferentes fatores muitas vezes acarreta uma resposta sinérgica em concentrações mais baixas, do que em concentrações mais elevadas de exposição, quando a capacidade de adaptação do sistema está esgotada e sua resposta acompanha o aumento da intensidade do impacto.

Entre as células hipertrofiadas do epitélio dos animais expostos ao herbicida 2,4-D foram observadas células clorídricas de diferentes tipos. Há muita incerteza em torno do papel da célula clorídrica no regulamento iônico em peixes de água doce. No ambiente de água doce, os peixes perdem continuamente íons através de suas superfícies corporais permeáveis, mais do que pelas brânquias, devido à sua grande área de superfície. No entanto, o equilíbrio iônico é conseguido como resultado de uma absorção mais ou menos equivalente de íons (Ca^{2+} , Cl^- , Na^+), a partir da água. Embora tenha sido amplamente assumido que a célula de cloreto é responsável pela absorção de Ca^{2+} , Cl^- e Na^+ da água, essa suposição é baseada em evidências indiretas e, provavelmente, é uma simplificação da real função desta célula (PERRY, 1997). Estas células têm sido estudadas, considerando a sua importância para as funções vitais da brânquia, e pelo fato destas proliferarem, quando expostas a ambientes desfavoráveis (PERRY; LAURENT, 1989; PERRY, 1997; PEREIRA; CAETANO, 2009).

Em teleósteos de água doce, estas células são consideradas como responsáveis por desempenhar um papel essencial na manutenção do equilíbrio iônico do ambiente interno por meio da absorção dos íons cloro (Cl^-) e sódio (Na^+), a partir do meio externo diluído. Em

consequência, a proliferação de células clorídricas é utilizada pelo peixe como um mecanismo para melhorar a capacidade de transporte de íons das brânquias em ambientes desfavoráveis (NESKOVIC et al., 1996). A partir desta observação, a previsão é de que a troca gasosa seria prejudicada em peixes que exibem uma quantidade excessiva de células clorídricas, uma vez que dificulta a difusão dos gases entre o sangue e a água (BINDON et al., 1994; PEREIRA; CAETANO, 2009).

Entretanto, Perry (1997) questionou o fato de existirem vários subtipos de células clorídricas ou se são a mesma célula em estágios diferentes de desenvolvimento. As células clorídricas observadas nos indivíduos expostos ao herbicida 2,4-D aparentemente apresentam mais variedade que o próprio grupo controle ou, comparado aos animais submetidos aos períodos de recuperação, nem sempre apresentam as mesmas células que o grupo exposto; esta observação incita a ideia de que existe a possibilidade da célula se manter quiescente e só se desenvolver caso haja necessidade fisiológica, uma vez que as células do tipo II aparentam ser a hipertrofia do tipo IV. A hipertrofia das células clorídricas também foi relatada em peixes expostos a urânio empobrecido (BARILLET et al., 2010), ao cádmio (THOPHON et al., 2003) e ao mercúrio (JAGOE et al., 1996). Fisiologicamente, as células clorídricas são responsáveis pela manutenção ácido/base e pelo equilíbrio iônico, protegendo os peixes de sofrer acidose ou alcalose metabólica (BARILLET et al., 2010). Elas também estão envolvidas em processos de excreção (PAWERT et al., 1998). Sendo assim, as células clorídricas hipertrofiadas podem, portanto, ter ocorrido pela necessidade de excretar alguma substância já absorvida pela brânquia ou pela necessidade de dificultar a difusão de gás entre água e sangue. Morgan et al. (1994, 1995) utilizaram microanálise de raios-x para demonstrar a função de absorção de Cl^- pelas células clorídricas em *Salmo trutta*, e Goss et al. (1992a, 1992b) também correlacionaram a capacidade de absorção de Cl^- com a área apical das células clorídricas em *Ictalurus nebulosus*, que foi aclimatados às condições ácidas ou alcalinas.

Chang et al. (2002) sugeriram que as células clorídricas dos tipos III e IV, aparecem em dominância em meio médio hipotônico. No meio com baixa concentração de Cl^- , foi predominante o tipo III de célula clorídrica, cuja morfologia apical é semelhante ao das células presentes nas brânquias de truta arco-íris tratadas com o cortisol ou NaHCO_3 (PERRY; GOSS, 1994). Portanto, segundo Chang et al. (2002), a estimulação da capacidade de absorção de íons Cl^- parece estar associada com um aumento de células clorídricas com maior área apical. Sendo

assim, a presença de células clorídricas com maior área apical observada neste estudo indica a uma maior troca iônica realizada com o meio.

O aumento das células mucosas foi o primeiro sintoma visível de toxicidade em *Perna viridis*, exposto ao chumbo, segundo Tan and Lim (1984). Takashina e Hibiya (1995) relataram que a hipersecreção pode ser o resultado de uma resposta crônica contra infecções parasitárias ou bacterianas ou contra produtos químicos irritantes. Nogarol et al. (2012) consideraram esta resposta, em *Diplodon expansus* (Bivalvia), como um mecanismo de proteção para evitar o acúmulo de herbicida (atrazina) e a entrada do poluente pela via branquial, comprometendo todo o organismo. O muco é normalmente encontrado nos filamentos, mas pode ser encontrado no epitélio respiratório de peixes expostos a condições de estresse, o que pode sugerir que a camada formada pela produção de muco proteja as superfícies lamelares contra os agentes tóxicos, infecciosos e partículas em suspensão (MALLAT, 1985). Devido à função de proteção do tecido que o muco apresenta (BERNET et al., 1999, DAVID; FONTANETTI, 2009), o aumento de células mucosas é um indicativo de presença de substâncias tóxicas na água, e, como apresentado nos resultados, o aumento foi observado em todos os animais dos grupos expostos quando comparado ao controle, indicando que o herbicida 2,4-D apresenta toxicidade ao organismo testado nas concentrações utilizadas.

A redução no número de células mucosas observadas em ambos os períodos de recuperação sugere que, com a retirada do estressor, a proliferação dessas células cesse, e ocorra a redução deste tipo celular, uma vez que, o número das células mucosas é alterado conforme a necessidade fisiológica do peixe em relação ao meio externo. Entretanto, observou-se também que, apesar do número de células mucosas ter reduzido após as recuperações, o mesmo não se observou com a camada de muco. Segundo Sze e Lee (1995), a produção excessiva de muco pode ter a função de fixar metais e depois excretar; ou todo metal absorvido pelo o corpo é concentrado no muco e depois expelido para o ambiente, dessa forma, pode-se inferir que, o tecido injuriado pela absorção do herbicida, apesar de ter sido totalmente recuperado, hipersecreta o muco para que não haja outro dano.

Sendo assim, observou-se que a presença do herbicida 2,4-D no ambiente aquático causa alterações em nível celular que prejudica o funcionamento do órgão estudado, comprometendo o equilíbrio fisiológico, podendo ocasionar a morte do indivíduo. No entanto, observou-se neste estudo que a retirada do herbicida do ambiente fez com que as alterações

regredissem, tornando o órgão em questão, novamente saudável para exercer as suas funções vitais.

7. CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas e dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

a) A análise ultramorfológica da superfície das brânquias de tilápias expostas às duas diferentes concentrações de herbicida 2,4-D foi eficiente para observar os diferentes tipos de células clorídricas e a hipertrofia das células pavimentosas das lamelas secundárias, assim como a regressão da hipertrofia nos animais submetidos à recuperação.

b) Pela análise histológica do tecido foi possível observar o desprendimento epitelial nas lamelas secundárias das brânquias de todos os animais expostos ao herbicida, a hipertrofia das células pavimentosas do epitélio lamelar e a presença de células clorídricas entre as células do epitélio nos animais de ambos os tratamentos, sendo que a frequência dessas alterações foi inversamente proporcional à concentração a qual foram expostos. Foi possível observar a regressão das alterações após os períodos de recuperação.

c) Pela análise histoquímica foi possível observar que o herbicida induziu a proliferação de células mucosas em todos os animais expostos, não sendo dose-dependente, uma vez que, a contagem dessas células foi semelhante nos dois tratamentos. Foi observada a redução gradual do número dessas células após os períodos de recuperação.

d) Pelos resultados pode-se concluir que o herbicida 2,4-D apresenta potencial tóxico aos peixes nas duas concentrações testadas (250 mg/L e 500 mg/L), porém, a recuperação dos danos após a retirada do mesmo do ambiente aquático foi comprovada, sendo possível inferir que a suspensão do uso do agrotóxico 2,4-D é efetivo quando se busca uma recuperação do ecossistema atingido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, C. Uso da acetilcolinesterase e metalotioneína em peixes na avaliação do efeito da contaminação da Baía de Guanabara, RJ. **Dissertação de Mestrado** submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), Rio de Janeiro, RJ, 2007.
- AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A.-F. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 9, p. 447-455, 2006.
- ALVES-COSTA, J. R. M. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação em chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. Curitiba: [s.n.]. **Dissertação de mestrado**, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2001.
- ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, p. 62-72, 1999.
- ATEEQ, B.; M. ABUL FARAH, M. NIAMAT ALI, WASSEM AHMAD. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research** v. 518, p. 135-144, 2002.
- ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; AHMAD, W. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. **Life sciences**, v. 78, n. 9, p. 977-86, 2006.
- BAILLY Y.; DUNEL-ER S.; LAURENT P. The neuroepithelial cells of the fish gill filament indolamine immunocyto chemistry and innervation. **Anatomical Record**, v. 233, p. 143-61, 1992.
- BARILLET, S.; LARNO, V.; FLORIANI, M.; DEVAUX, A.; ADAM-GUILLERMIN, C. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. **Aquatic toxicology**, v. 100, p. 295-302, 2010.
- BENLI, A.Ç.K., SARÂKAYA, R., SEPICI-DINCEL, A., SELVI, M., SAHIN D., ERKOÇ, F. Investigation of acute toxicity of (2, 4-dichlorophenoxy) acetic acid (2, 4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 296-299, 2007.
- BERNET, D.; SCHMIDT, 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.

BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v. 40, p. 839-844, 2009.

BINDON, S.D.; GILMOUR, K.M.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F. The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**, v.197, p. 47–63, 1994.

BOZZATTO, V. ; FONTANETTI, C.S. Sewage sludge toxicity in edaphic organism: Analysis of midgut responses in the diplopod *Rhinocricus padbergi*. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 869-875, 2012.

BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.47, p.117-124, 2000.

BRITO, L. T. Análise de brânquias de peixes expostos às águas de ambiente lântico. **Trabalho de conclusão de curso (TCC)**. UNESP – IB – Rio Claro/SP, 2009.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR.; O.P.; ABAKERLI, R.; SANTOS, T. C.R.; RIBEIRO, M.L. Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: análise preliminar. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.11, p. 93-104, 2001.

CALDAS, E.; SOUZA, L. C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.34, p. 529-537, 2000.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M. et al. Silagem de resíduo de peixes em dietas para alevinos de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 126-130, 2006.

CASTAGNOLLI, N. **Criação de peixes de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, p. 189, 1992.

CATTANEO, R., LORO, V. L., SPANEVELLO, R., SILVEIRA, F.A., LUZ, L., MIRON, D.S., FONSECA, M.B., MORAES, B.S., CLASEN, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.92, p.133–137, 2008.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, p. 83-91, 2002.

CHANG, I.; LEE, T.; WU, H.; HWANG, P. Effects of Environmental Cl⁻ Levels on Cl⁻ Uptake and Mitochondria-rich Cell Morphology in Gills of the Stenohaline Goldfish. **Zoological Studies**, v. 41, p. 236–243, 2002.

CHINGOMBE, P.; SAHA, B.; WAKEMAN, R. J. Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benazolin from water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, p. 44-442, 2006.

CHRISTOFOLETTI, C. A. ; DAVID, J. A. O. ; FONTANETTI, C.S. . Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): a methodological comparison. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 155-158, 2009.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J. ; FONTANETTI, C.S. Assessment of the Genotoxicity of Two Agricultural Residues After Processing by Diplopods Using the *Allium cepa* Assay. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 224, p. 1523, 2013.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, nº7, p.1820-1830, 2008.

COSTA-PIERCE, B. A. Rapid evolution of the established feral tilapia (*Oreochromis* spp.): the need to incorporate invasion science into regulatory structures. **Biology Environmental Magazine**, v. 5, p. 71-84, 2003.

DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. The Role of Mucus in *Mytella falcata* (Orbigny 1842) Gills from Polluted Environments. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 203, p. 261–266, 2009.

DAVID, J.A.O.; SALAROLI, R.B.; FONTANETTI, C.S. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. **Micron**, v. 39, p.1293-1299, 2008.

DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos estuary. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 22, p. 203-210, 2005.

EVANS, D. H. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspect**, v.71, p.47-58, 1987.

FANTA, E.; RIOS, F.S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 54, p. 119-130, 2002.

FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T. S.; CHRISTOFOLETTI, C. A.. **The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources**. In: Bilibio, C.; Hensel, O.; Selbach, J. (Org.). Sustainable water management in the tropics and subtropics - and cases study in Brazil. Brasil/Alemanha: UNIPAMPA/UNIKASSEL, v. 3, p. 975-1005, 2012.

FOSKETT J.K.; SCHEFFEY C. The chloride cell: definitive identification as the salt-secreting cell in teleosts. **Science**, v. 215, p. 164–66, 1982.

GALLI, L. F.; TORLONI, C. E. C. **Criação de peixes**. Editora Nobel, 2ª edição; São Paulo, 1984.

GERAS'KIN, S. A.; KIM, J. K.; DIKAREV, V. G.; OUDALOVA, A. A.; DIKAREVA, N. S.; SPIRIN Y. V. Cytogenetic effects of combined radioactive (^{137}Cs) and chemical (Cd, Pb, and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalary meristem cells. **Mutation Research**, v. 586, p. 147–159, 2005.

GIRÓN-PÉREZ, M. I.; SANTERRE, A.; GONZALEZJAIME, F.; CASAS-SOLIS, J.; HERNANDEZ CORONADO, M.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; TAKEMURA, A.; ZAITSEVA, G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 23, p. 760-769, 2007.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 392, 2005.

GOSS, G.G.; LAURENT, P.; PERRY, S.F. Evidence for a morphological component in acid-base regulation during environmental hypercapnia in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). **Cell and Tissue Research**, v. 268, p.539-552, 1992a.

GOSS, G.G.; PERRY, S.F.; WOOD, C.M.; LAURENT, P. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 263, p.143-159, 1992b.

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J. B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 94, p. 1-32, 1990.

HOLT, M. S. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 21-27, 2000.

HOSHINA, M.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v. 656, p. 44–48, 2008.

JAGOE, C.H.; FAIVRE, A.; NEWMAN, M.C. Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II). **Aquatic toxicology**, v. 34, p. 163–183, 1996.

JAGOE, H.C.; HAINES, T.A. Changes in gill morphology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environmental Pollution**, v. 97, p.137-146, 1997.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, p. 123, 1983.

KALE, P.G.; PETTY, B.T.; WALKER, S.; FORD, J.B.; DEHKORDI, N.; TARASIA, S.; TASIE, B.O.; KALE, R.; SOHNI, Y.R. Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, p. 148-153, 1995.

KARNOVSKY, M. J.; A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 11, p. 137-140, 1965.

KELLY, J.R.; HARWELL, M.A. **Indicators of ecosystem response and recovery**. In: Levin, S.A.; Harwelin, M.A.; Kelly, J. R. and Kimball, K.D. *Ecotoxicology: Problems and Approaches*, New York, Spring Vertag, p. 9-40. 1989.

KENNEPOHL, E.; MUNRO, I. C. **Phenoxy Herbicides (2,4-D)** In: KRIEGER, R. *Handbook of Pesticide Toxicology: Principles*, c.72, v.2, 2011.

KEYS, A.B.; WILMER E.N. Chloride secreting cells in the fills of fishes with special references to the commoneel. **Journal of Physiology**, v. 76, p. 368–77, 1932.

KIKUCHI, M.; WAKABAYASHI, M.; KOJIMA, H.; YOSHIDA, T. Uptake, distribution and elimination of sodium linear alkylbenzene sulfonate and sodium alkyl sulfate in carp. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.2, p.115 – 127, 1978.

KUBRAK, O. I.; ATAMANIUK, T. M.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Gold fi sh can recover after short-term exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetate: Use of blood parameters as vital biomarkers. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 157, n. 3, p. 259–265, 2013.

LAURENT, P.; HOBE, H.; DUNEL-ERB, S. The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. **Cell and Tissue Research**, v. 240, p. 675-692, 1985.

LAURENT, P.; PERRY, S.F. Effect of cortisol on gill chlorid cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, v. 259, p. 429-442, 1990.

LAURENT, P; PERRY, S. F. Environmental effects on fish Gill morphology. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 64, p. 4-25, 1991.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 42, p. 630-648, 1985.

MARIA, V. L.; CORREIA A. C.; SANTOS M. A. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary treated effluents on *Anguila anguila* L. **Ecotoxicology and Enviromental Safety**, v. 55, p. 126-137, 2003.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics And Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MAZON, A.F.; CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill cellular changes induced by cooper exposure in the south American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research**, Section A, v. 88, p. 52-63, 2002.

McKIM, J. M.; ERICKSON, R. J. Environmental impacts on the physiological mechanisms controlling xenobiotic transfer across fish gills. **Physiological Zoology**, v. 64, p. 39-67, 1991.

MERLINI, V.V.; NOGAROL, L. R. ; MARIN-MORALES, M. A.; FONTANETTI, C.S. . Toxicity of trifluralin herbicide in a representative of the edaphic fauna: histopathology of the midgut of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 1361-1369, 2012.

MISHRA, V.; LAL, H.; CHAWLA, G.; VISWANATAN, P.N. Pathomorphological changes in the gills of fish fingerlings (*Cirrhina mimgala*) by lineal alkylbenzene sulfonate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 10, p. 302–308, 1985.

MORGAN, I.J., POTTS, W.T.W, OATES, K. Intracellular ion concentrations in branchial epithelial cells of brown trout (*Salmo trutta* L.) determined by x-ray microanalysis. **Journal of Experimental Biology**, v.194, p.139-151, 1994.

MORGAN, I.J., POTTS, W.T.W. The effects of the adrenoreceptor agonist phenylephrine and isoproterenol on the intracellular ion concentrations of branchial epithelial cells of brown trout (*Salmo trutta* L.). **Journal of Comparative Physiology**, v.165B, p.458-463, 1995.

MOUSA, M. A; MOUSA, S.A. Immunocytochemical Study on the Localization and Distribution of the Somatolactin Cells in the Pituitary Gland and the Brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, p. 197-211, 1999.

MUSTONEM, R.; KANGAS, J.; VUOJOLAHTI, P.; LINNAINMMA, K. Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations *in vitro* and *in vivo*. **Mutagenesis**, v. 16, p. 37-48, 1986.

NCR: Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 3-9, 1987.

NESKOVIC, N.K.; POLEKSIC, V.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; BUDIMIR, M. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.56, p. 295–302, 1996.

NOGAROL, L. R.; BROSSI-GARCIA, A. L. ; FONTANETTI, C. S. Surface morphology of *Diplodon expansus* (Kuster, 1856; Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) gill filaments after exposure to environmentally relevant concentrations of atrazine herbicide. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, p. 807-813, 2012.

ODUM, E.P. **Breve descrição dos principais tipos de ecossistema natural na biosfera**. In: Ecologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.367-369, 1988.

- ORUÇ, E. Ö., ÜNER, N. Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. **Environmental Pollution**, v. 105, p. 267-272, 1999.
- PAWERT, M.; MULLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarkers to assess small stream pollution. **Tissue Cell**, v. 30, p. 617–626, 1998.
- PEREIRA, B. F.; CAETANO, F. H. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. **Micron**, v. 40, p. 783-786, 2009.
- PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**. IPH-UFRGS. v. 1, p. 20-36. 2004. <http://www.abrh.org.br/informacoes/erh.pdf>
- PERRY, S.F.; GOSS, G.G. The effects of experimentally altered gill chloride cell surface area on acid-base regulation in rainbow trout during metabolic alkalosis. **Journal of Comparative Physiology**, v.164B, p.327-336, 1994.
- PERRY, S. F.; LAURENT, P. **Environmental effects on fish gill structure and function**. In Fish Ecophysiology. Rankin, J. C.; Jensen, F. B. (Eds). London: Chapman & Hall, p. 231–264, 1993.
- PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 325–347, 1997.
- PERRY, S.F.; LAURENT, P. Adaptational responses of rainbow trout to lowered external NaCl concentration: contribution of the branchial chloride cell. **Journal of Experimental Biology**, v. 147, p. 147–168, 1989
- PISAM, M.; RAMBOURG, A. Mitochondria rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. **International Review of Cytology**, v.130, p. 191–232, 1991.
- PONCE-MARBÁN, D.; HERNÁNDEZ, J. M.; GASCA-LEYVA, E. Simulating the economic viability of Nile tilapia and Australian redclaw crayfish polyculture in Yucatan, Mexico. **Aquaculture**, v. 261, p. 151-159, 2006.
- POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v. 246, p. 352-358, 1989.
- RANDI A. S.; MONSERRAT, J. M.; RODRIGUEZ, E. M. ; ROMANO L. A. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). **Journal of Fish Diseases**, v. 19, p. 311–322, 1996.
- RANKIN, J. C.; ATAGG, R. M.; BOLIS, L. **Effects of pollutants on gills**. In-Gills, eds. D. F. Houlihan, J. C. Rankin, T. J., Shuttleworth. Cambridge University Press, New York, p. 207-220, 1982.

RIBEIRO, B.T.; LIMA, J.M.; JULIÃO, L.G.F. Influência da vinhaça na adsorção e dessorção de Cd e Pb em um cambissolo. **XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2007.

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F. J.; ROSETY M.; ROSETY, J. M.; ROSETY, I.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho-histochemical Changes in the Gills of Turbot, *Scophthalmus maximus* L., Induced by Sodium Dodecyl Sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, p.223-228, 2002.

SALAZAR-LUGO R.; ESTRELLA A.; OLIVEROS A.; ROJAS-VILLARROEL E.; VILLALOBOS B.L.; LEMUS M. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. **Environmental Pharmacology and Toxicology**, v. 27, p. 321–326, 2009.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; GARCIA-VALCARCEL, A. I.; TADEO, J. L. Determination of residues of phenoxi acid herbicides in soil and cereals by gas chromatography-ion trap detection. **Journal of Chromatography A**, v. 675, p. 213- 218, 1994.

SANTOS, E. **Pesca e piscicultura**. Editora Itatiaia Limitada; Belo Horizonte, 1977.

SANTOS, G.A; ROSSIELLO, R.P.; FERNANDES, M.S. Efeitos da vinhaça sobre o pH do solo, a germinação e acúmulo de potássio em milho. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 16, p. 489-493, 1981.

SOUZA, R. B.; FONTANETTI, C.S. Alterations in the fat body cells of *Rhinocricus padbergi* (Diplopoda), resulting from exposure to substrate containing sewage sludge. **Microscopy and Microanalysis**, v. 18, p. 317-323, 2012.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 605, p. 87-93, 2006.

SOUZA,T.S.; HENCKLEIN,F.A. ; ANGELIS, D.F.; GONÇALVES, R.A.; FONTANETTI, C.S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1363-1368, 2009.

SRIVASTAVA, N.; SAHAI, R. Effects of distillery wastewater on the performance of *Cicer arietinum* **Environmental Pollution**, v. 43, p. 91-102, 1987.

STREIT, B. **Bioaccumulation of contaminants in fish**. In: Braunbeck, T.; Hinton, D.E.; Streit, B. (Ed.). *Fish ecotoxicology*. Basel: Birkhauser, p. 353-387, 1998.

SULIK, M.; PILAT-MARCINKIEWICZ, B.; SULIK, A.; MACHALA-BARWIJUK, M.; SULKOWSKA, M.; BALTAZIAK, M.; KLEPACKA, J. Fetotoxic effects of 2,4-dichlorophenylacetic (2,4-D) in rats. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku**, v. 43, p. 298-308,1998.

SZE P.W.C; LEE S.Y. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 390–393, 1995.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2. ed. Tokyo: Kodansha / Stuttgart: Fischer Verlag, p. 95, 1995.

TAN, W.; LIM, L. The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis* (L.). **Aquaculture**, v. 42, p. 317–332, 1984.

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, p. 307–320, 2003.

TOMLIN, C. (Ed.). **The pesticide manual: incorporating the agrochemicals handbook**. 10th ed. Cambridge: British Crop Protection Council, the Royal Society of Chemistry, p. 1341, 1994.

TUKULA, T.E.; JALAL, S.M. Increase rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicide 2,4-D. **Journal of Heredity**, v. 76, p. 213-214, 1985.

UNICA – União da Indústria da cana-de-açúcar do estado de São Paulo. Produção de álcool do Brasil. UNICA, 2007. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/index.php?Secao=referencia&SubSecao=estatisticas&SubSacao=producao20Brasil&id=%20and%id=9>>. Acesso em: 10/06/12.

VAN der OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 13, 2003.

VEGA, M.M.; FERNANDEZ, T.B.; TARAZONA, J.V.; CASTAÑO, A. Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental Pollution**, v. 92, p. 135-139, 1996.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWANA, G. K. Food deprivation effects sewerage acclimation in Tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal Experimental Biology**, v. 199, p. 2467-2475, 1996.

WENDELAAR BONGA, S. E.; LOCK, R. A. C. Toxicants and Osmoregulation in Fish. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 42, p. 478-493, 1991.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface Waters. **Mutation Research**, v. 410, p. 223-236, 1998.

WHO (World Health Organization), Switzerland. **2,4- Dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D)**, Environmental Health Criteria, v. 29, 1984.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva, 1993.

WONG, K.C.; WONG, M.H. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic toxicology**, v. 48, p. 517–527, 1999.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, p. 478, 2006.

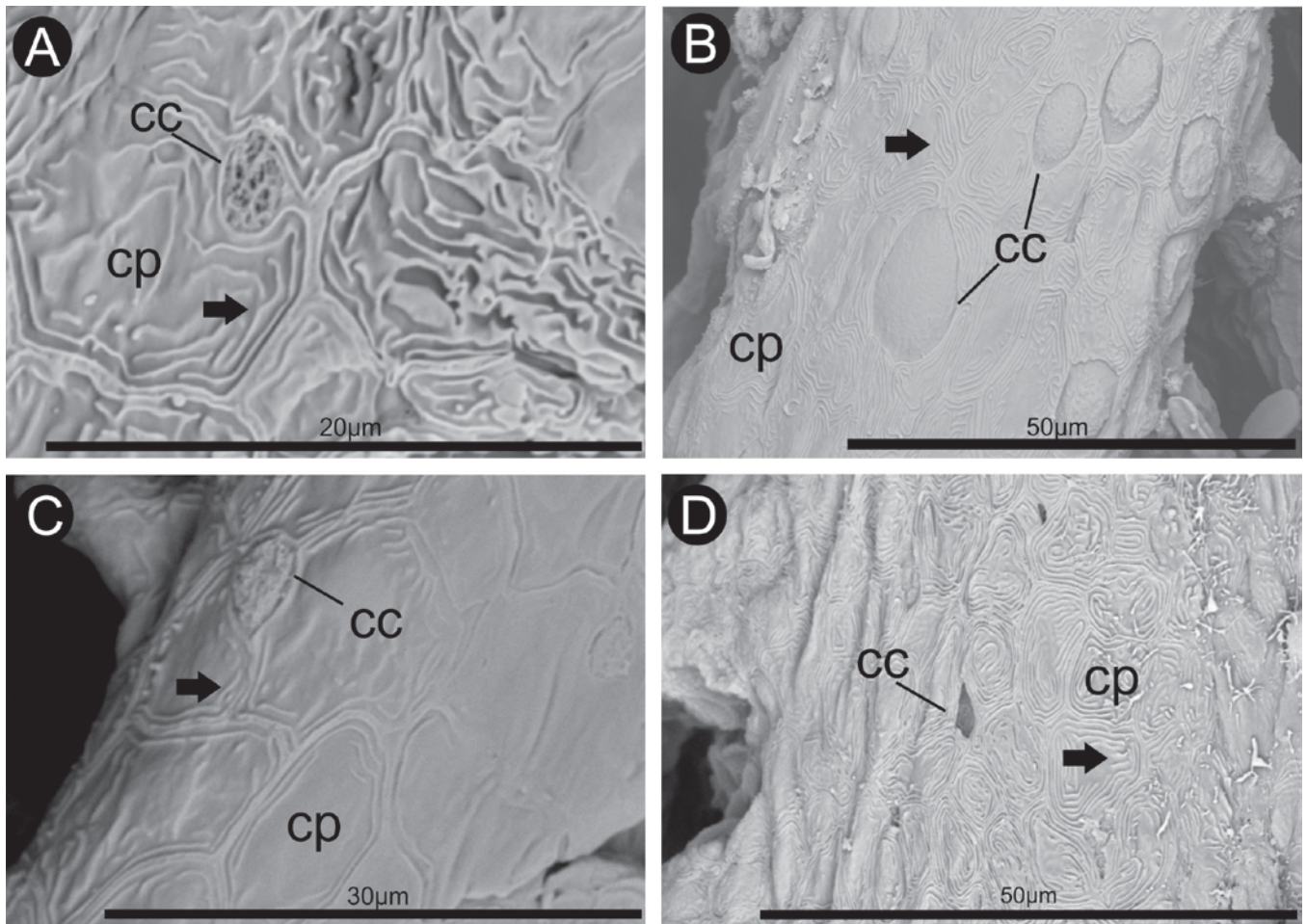


Figura 1: Micrografias eletrônicas de varredura de brânquia de *O. niloticus*. A: Célula clorídrica do tipo I; B: Célula clorídrica do tipo II; C: Célula clorídrica do tipo III; D: Célula clorídrica do tipo IV. cc: célula clorídrica; cp: célula pavimentosa; setas: cristas das células pavimentosas.

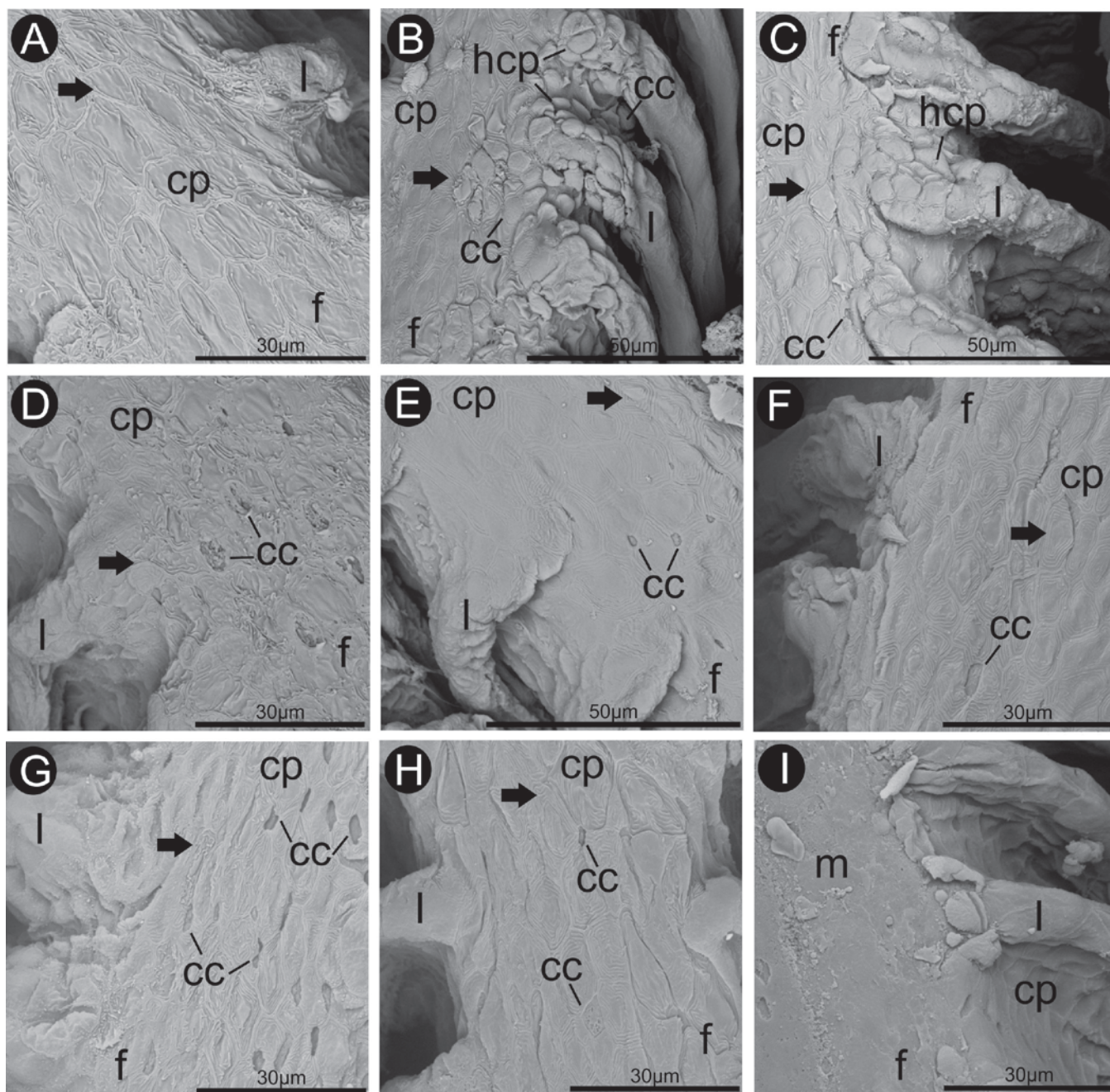


Figura 2: Micrografias eletrônicas de varredura de brânquia de *O. niloticus*. A , D e G: Grupo controle; B, E e H: Grupo exposto à 250 mg/L de 2,4-D; C, F e I: Grupo exposto à 500 mg/L de 2,4-D. A, B e C: Exposição por 96 horas; D, E e F: Após 96 horas de recuperação; G, H e I: Após 192 horas de recuperação. f: filamento primário; l: lamela secundária; cc: célula clorídrica; cp: célula pavimentosa; hcp: hipertrofia da célula pavimentosa, m: muco; setas: cristas das células pavimentosas.

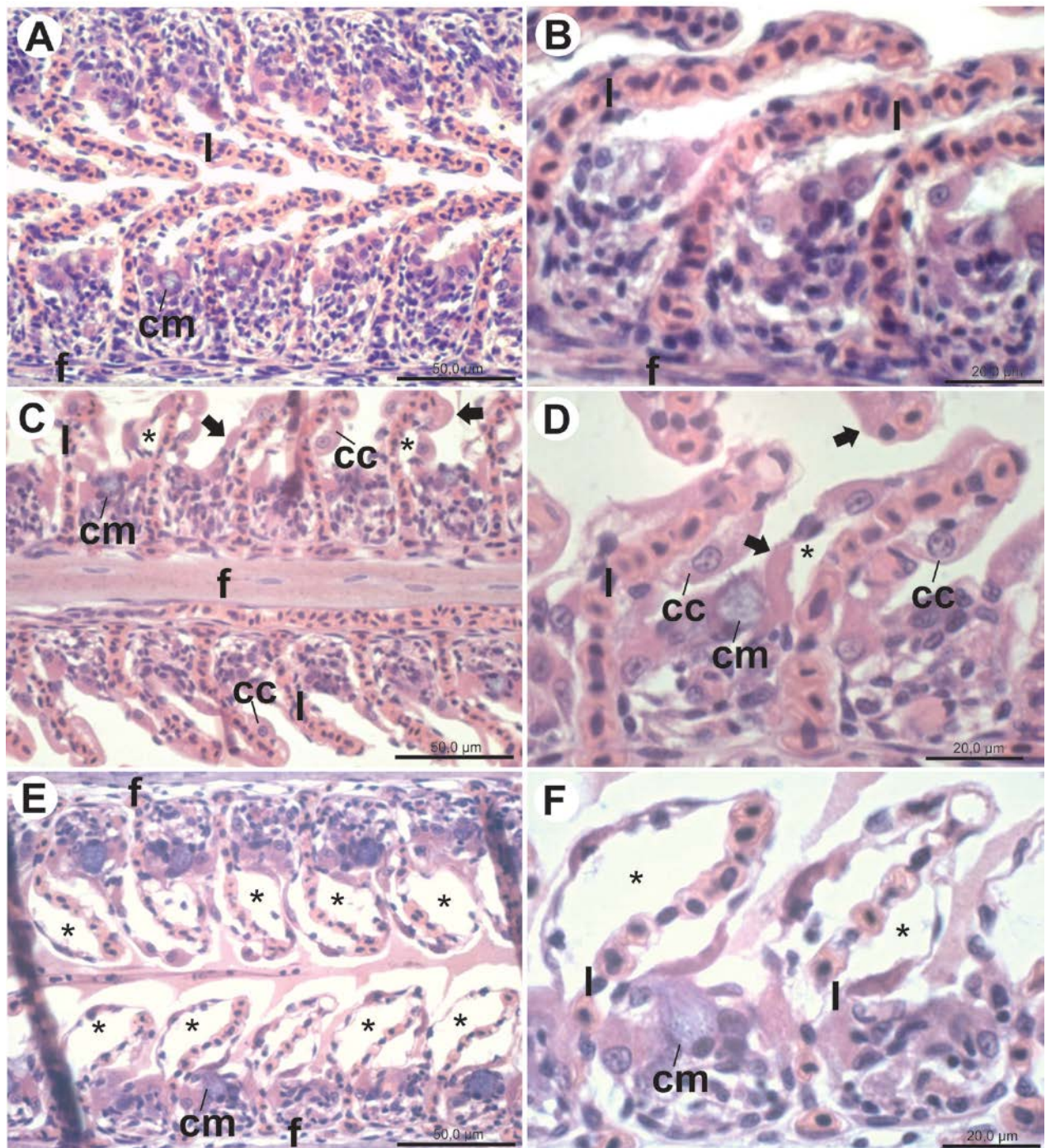


Figura 3: Fotomicrografias de brânquias de *O. niloticus*. A e B: Grupo controle; C e D: Grupo exposto à 250 mg/L de 2,4-D; E e F: Grupo exposto à 500 mg/L de 2,4-D. f: filamento primário; l: lamela secundária; cc: célula clorídrica; cm: célula mucosa; seta: hipertrofia da célula pavimentosa ; *: desprendimento epitelial.

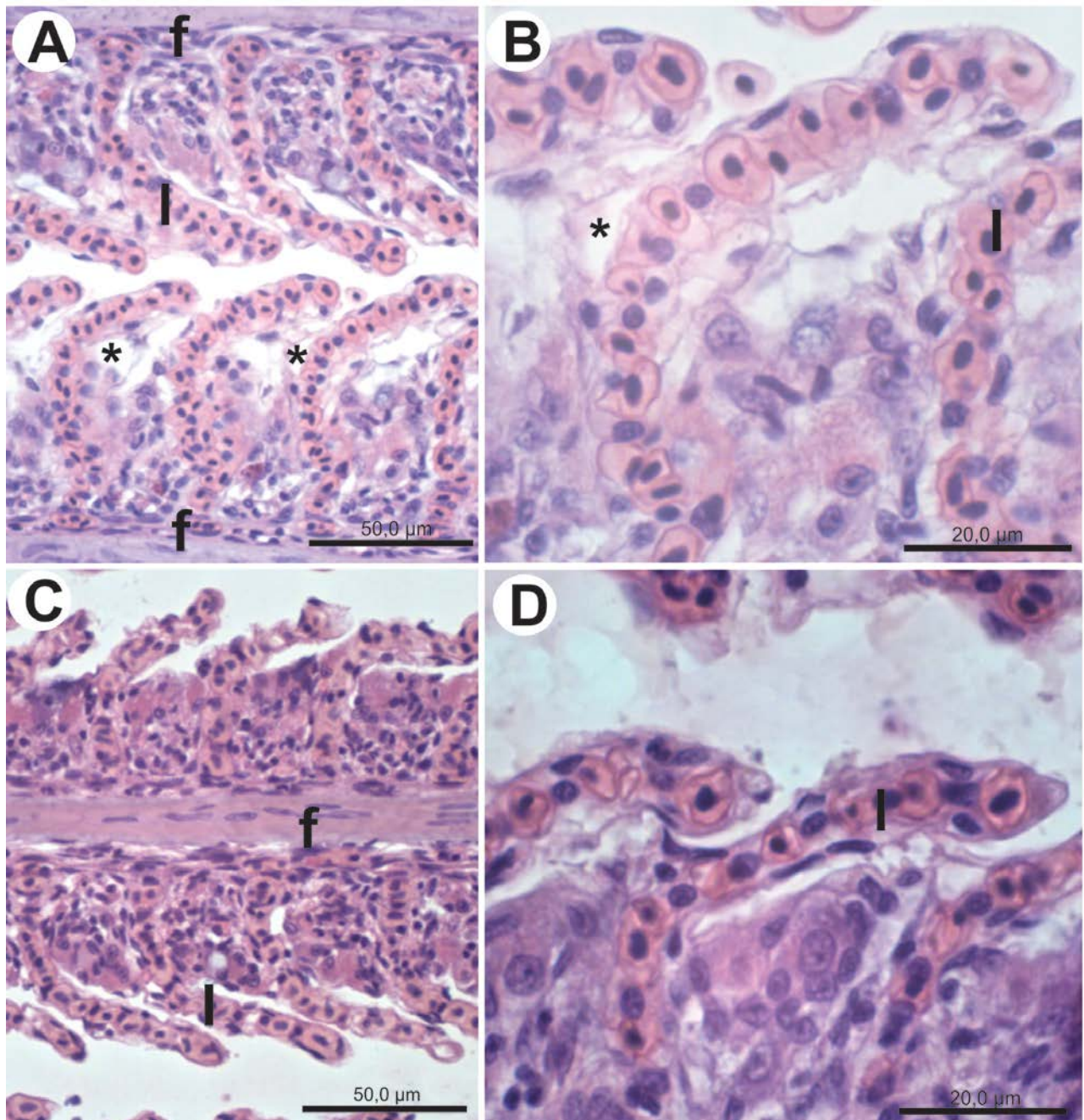


Figura 4: Fotomicrografias de brânquia de *O. niloticus* após o 96 horas de recuperação. A e B: Grupo exposto à 250 mg/L de 2,4-D; C e D: Grupo exposto à 500 mg/L de 2,4-D. f: filamento primário; l: lamela secundária; *: desprendimento epitelial.

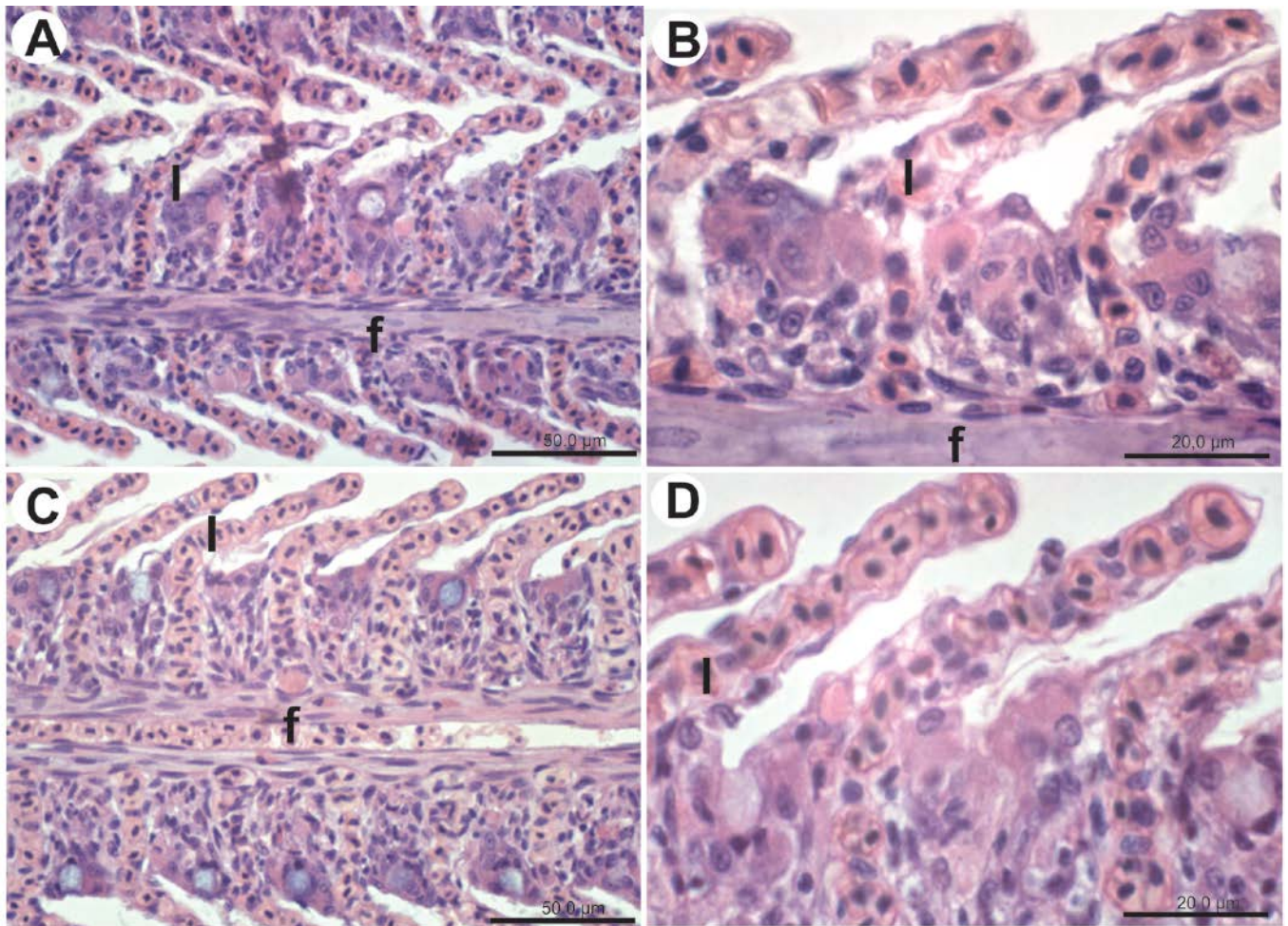


Figura 5: Fotomicrografias de brânquias de *O. niloticus* após 192 horas de recuperação. A e B: Grupo exposto à 250 mg/L de 2,4-D; C e D: Grupo exposto à 500 mg/L de 2,4-D. f: filamento primário; l: lamela secundária.

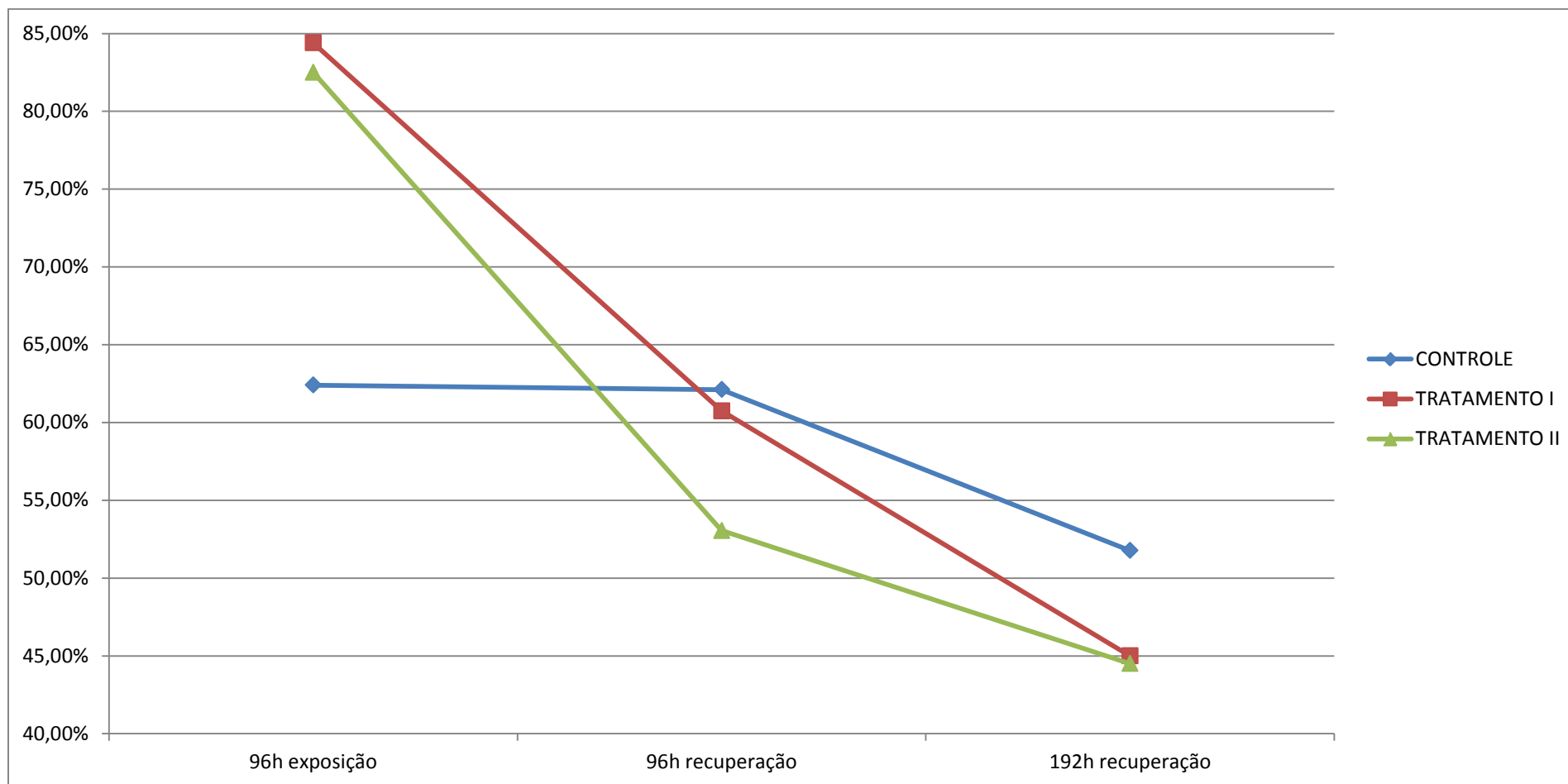


Figura 6: Porcentagem de células mucosas de cada grupo, após a exposição e os períodos de recuperação.

Tabela 2 – Média (M), desvio padrão (DP) de células clorídricas quantificadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes concentrações de 2,4-D

Tratamento			
	Máxima	Mínima	M±DP
0 mg/L	73	57	61,8±6,9
250 mg/L	141	115	132,6±10,5
500 mg/L	106	67	87,5±16

Tabela 3 – Média (M), desvio padrão (DP) de células clorídricas quantificadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes concentrações de 2,4-D após o primeiro período de recuperação (96 horas)

Tratamento			
	Máxima	Mínima	M±DP
0 mg/L	116	70	93,5±23,3
250 mg/L	136	84	102,6±28,9
500 mg/L	107	73	85,5±14,8

Tabela 4 – Tipos de células clorídricas observadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* de cada tratamento e período analisado

Tratamento	Tipos de células clorídricas		
	Exposição	Recuperação 96 horas	Recuperação 192 horas
0 mg/L	I, III, IV	I, IV	III, IV
250 mg/L	I, II, III, IV	III, IV	I, III, IV
500 mg/L	II, III, IV	II, IV	

Obs: Nos animais do tratamento de 500 mg/L, após recuperação de 192 horas, não foram observados células clorídricas pela presença de muco recobrimdo toda a superfície da brânquia.

Tabela 5 – Média (M), desvio padrão (DP) e frequência de células mucosas quantificadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes concentrações de 2,4-D

Tratamento				
	Máxima	Mínima	M±DP	Frequência
0 mg/L	122	95	112,33±15,04	62,40%
250 mg/L	170	121	152±22,01	84,40%
500 mg/L	181	105	148,5±34,57	82,50%

Tabela 6 – Média (M), desvio padrão (DP) e frequência de células mucosas quantificadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes concentrações de 2,4-D após 96 horas de recuperação

Tratamento	Máxima	Mínima	M±DP	Frequência
0 mg/L	153	72	111,8±33,29	62,11%
250 mg/L	137	85	109,33±26,15	60,74%
500 mg/L	138	73	95,5±29,01	53,05%

Tabela 7 – Média (M), desvio padrão (DP) e frequência de células mucosas quantificadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes concentrações de 2,4-D após 192 horas de recuperação

Tratamento				
	Máxima	Mínima	M±DP	Frequência
0 mg/L	100	87	93,2±5,63	51,77%
250 mg/L	96	70	81±12,27	45%
500 mg/L	100	53	80,2±19,29	44,5%

Tabela 8: Valores dos índices de alterações das diferentes alterações observadas nas brânquias de *O. niloticus* expostos ao herbicida 2,4-D, antes e após recuperação

		Desprendimento do epitélio lamelar	Hipertrofia das células pavimentosas	Aumento no número de células mucosas	Aumento no número de célula clorídrica
Exposição 96h	CN	0	0	2,83±0,28	2,7±0,27
	T1	4,2±0,4472*	4,2±0,4472*	4,5±0,5	5,6±0,41*
	T2	2,2±0,4472	2,2±0,4472	5,16±1,04	4±0,81
Recuperação 96h	CN	0	0	2,66±0,28	3,75±0,86
	T1	0,33±0,577	0 ^b	2,83±0,28	4±0,86
	T2	0,2±0,2738	0 ^b	2,66±0,28	3,6±0,62
Recuperação 192h	CN	0	0	2,5±0	-
	T1	0	0 ^b	2,16±0,28 ^b	-
	T2	0 ^b	0 ^b	2,16±0,28 ^b	-

CN: Controle; **T1:** exposição à 250mg/L de herbicida; **T2:** exposição à 500mg/L de herbicida.

*Valores estatisticamente significativos, pelo método Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$, quando comparados tratamentos com o controle.

^b Valores estatisticamente significativos, pelo método Kruskal-Wallis, com $p < 0,05$, quando comparados recuperação em relação à exposição.

- Estes valores não puderam ser obtidos pois o tecido observado estava coberto por muco, o que prejudicou a observação e contabilização das células.