

TOXICIDADE AGUDA E EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DO DIQUATE NA BRÂNQUIA E NO FÍGADO DO PIAUÇU (*Leporinus macrocephalus*)

MATHEUS NICOLINO PEIXOTO HENARES*
CLAUDINEI DA CRUZ**
GABRIELA RONCADA GOMES*
ROBINSON ANTONIO PITELLI***
MARCIA RITA FERNANDES MACHADO****

A concentração letal CL (l) _(50-96h) e os efeitos histopatológicos do diquate para o piauçu (*Leporinus macrocephalus*) foram avaliados em três experimentos conduzidos em condições de laboratório. Os peixes foram expostos às concentrações de 0; 12; 18; 24; 30; 36; 42; 48; 54; e 60 mg de diquate/L e a histologia da brânquia e do fígado avaliada nos peixes sobreviventes. A concentração letal CL (l) _(50-96h) foi de 34,76 mg/L. Nos tratamentos controle, 12 e 18 mg/L as brânquias dos peixes estavam revestidas por epitélio estratificado que em intervalos regulares formaram as lamelas secundárias, constituídas por duas camadas de células epiteliais pavimentosas, células pilares, células-cloreto e células mucosas. Nos tratamentos com 24, 30, 36, 42, e 48 mg/L ocorreu hiperplasia das células de revestimento, das mucosas e das células cloreto no espaço interlamelar. No tratamento com 54 mg/L verificou-se edema subepitelial e fusão apical das lamelas secundárias. O fígado do piauçu nos tratamentos controle e 12 mg/L apresentaram arranjo cordonal dos hepatócitos. Nos tratamentos com 18, 24, 30, 36, 42, 48 e 54 mg/L ocorreu congestão no interior dos capilares sinusóides. Nos tratamentos com 48 e 54 mg/L constatou-se a presença de grânulos de glicogênio no interior da célula, início de necrose dos hepatopâncreas, congestão e fusão celular. O diquate mostrou-se pouco tóxico para o *L. macrocephalus*, e as alterações histopatológicas que ocorreram na brânquia e no fígado dos peixes são reversíveis.

PALAVRAS-CHAVE: HERBICIDA; DIQUATE; TOXICIDADE; HISTOPATOLOGIA; *Leporinus macrocephalus*.

- * Mestrando em Aqüicultura de Águas Continentais, Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista (CAUNESP), Câmpus de Jaboticabal (e-mail: picolino_bio@yahoo.com.br).
** Doutor em Aqüicultura de Águas Continentais, CAUNESP, Câmpus de Jaboticabal (e-mail: cruzcl@yahoo.com).
*** Doutor em Agronomia, Solos e Nutrição de Plantas, Professor do Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal (e-mail: rapitelli@ecosafe.agr.br).
**** Doutora em Medicina Veterinária, Anatomia dos Animais Domésticos, Professora, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal (e-mail: mrfmach@fcav.unesp.br).

1 INTRODUÇÃO

As macrófitas aquáticas são importantes componentes dos ecossistemas aquáticos. Fazem parte do primeiro nível trófico da cadeia alimentar, proporcionando abrigos para desova e proteção das fases jovens da fauna aquática. Porém, o aumento da disponibilidade de nutrientes nos corpos hídricos favorece o crescimento de densas e extensas colonizações de macrófitas. Esse processo reduz a disponibilidade de oxigênio, a diversidade biológica e impede os usos múltiplos dos recursos hídricos (PITELLI, 1998).

O problema com macrófitas aquáticas têm crescido no Brasil, especialmente em reservatórios de hidrelétricas. O uso de herbicidas, como o diquate, fluridona, os compostos de cobre, o endotal, o 2,4-D e o glifosato têm tido importância significativa nesses locais devido à eficácia no controle (MARCONDES et al., 2003).

O herbicida diquate, 1-1'-etileno-2-2'-dibrometo de bupiridílio, é muito utilizado nos Estados Unidos para o controle de macrófitas (SYNGENTA, 2002) e no Brasil têm sido testado para o controle de macrófitas aquáticas flutuantes (PITELLI et al., 2004) e submersas (VELINI, 2005).

O mecanismo de ação do diquate promove a formação de radicais livres a partir de elétrons capturados do fotossistema I, do processo de fotossíntese, em níveis energéticos compatíveis com a da ferredoxina. Tais radicais livres promovem a oxidação de lipídeos, tendo como principal conseqüência a ruptura das membranas celulares levando à necrose de tecidos (HESS, 1993).

Para o diquate, assim como para qualquer xenobiótico a ser empregado no ambiente ou no tratamento de saúde, a avaliação ecotoxicológica é fundamental para a regulamentação do seu uso e classificação quanto ao potencial de risco ambiental. A identificação do perigo e avaliação da relação dose-resposta constituem etapas iniciais no processo de avaliação ecotoxicológica (USEPA, 2002), sendo os estudos de toxicidade aguda importantes na estimativa do risco ambiental do uso de pesticidas (PARMA de CROUX, LOTESTE e CAZENAVE, 2002).

Estudos sobre a toxicidade aguda dos herbicidas em organismos aquáticos foram realizados com glifosato em invertebrados aquáticos (HENRY, HIGGINS e BUHL, 1994) e em sapos australianos (MANN e BIDWELL, 1999), com o diquate em *Ctenopharyngodon idella* (SALAH EL-DEEN e ROGERS, 1992) e *Ictalurus punctatus* (SCHULTZ, HAYTON e KEMMENOE, 1995). Também foram testados o 2,4-D em *Tinca tinca* (GÓMEZ et al., 1998), o paraquate em *Oreochromis niloticus* (BABATUNDE, OLADIMEJI e BALOGUN, 2001) e clomazona, quincloraque e metsulfurom metílico em *Ramdhia quelen* (MIRON et al., 2005).

Além do efeito tóxico, a utilização de herbicidas no ambiente aquático para o controle de macrófitas pode provocar danos na morfologia dos peixes. O glifosato causou hiperplasia epitelial, edema subepitelial, hipertrofia das células-cloreto na brânquia de carpa capim (*Cyprinus carpio*) e focos de fibrose no fígado (NESKOVIC et al. 1996). Em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), o glifosato causou proliferação das células do filamento, hiperplasia, fusão lamelar e aneurisma na brânquia, vacuolização e picnose nuclear no fígado e dilatação do espaço de Bawman's no rim (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002).

Espécies do gênero *Leporinus*, endêmico do Pantanal mato-grossense e da bacia do Paraná-Paraguai (GARAVELLO e BRITSKI, 1988), podem ser utilizadas como organismo-teste (espécie autóctone) em estudos de toxicidade aguda de agrotóxicos de acordo com o IBAMA (1987) e a CETESB (1999). A presença de herbicidas no ambiente aquático nas formas direta e indireta para o controle de infestações de macrófitas aquáticas submersas (VELINI, 2005) tornou necessária a obtenção de informações sobre a toxicidade aguda e os efeitos adversos que esses produtos provocam nos peixes.

Este trabalho foi conduzido com os objetivos de estimar a concentração letal (CL (I)_(50-96h)) do diquate para o piauçu (*Leporinus macrocephalus*) e avaliar os efeitos histopatológicos na brânquia e no fígado dos peixes expostos a concentrações subagudas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Impacto Ambiental do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (Nepeam) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal (21° 18' S e 48° 18' W).

Usou-se formulação Reward® com 447 g/L do sal dibrometo de diquate e 240 g/L do cátion diquate, inserida na classe toxicológica II.

Os peixes utilizados nos testes pesavam $7,74 \pm 1,17$ g e foram aclimatados em sala de bioensaio com temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h por 10 dias. A aclimação ocorreu em caixa de amianto de 250 L com sistema de aeração contínuo, promovido por bombas de ar. Nesse período, os peixes receberam ração comercial *ad libitum* uma vez ao dia.

Usou-se sistema de condução dos testes estático, sem substituição ou sifonagem de água e sem alimentação durante o período de 96 horas de exposição dos peixes ao herbicida. Efetuou-se avaliação diária da mortalidade com a retirada dos peixes mortos das unidades experimentais.

As características da água foram mantidas em pH $7,45 \pm 0,5$, concentração de oxigênio dissolvido $7,74 \pm 0,4$ mg/L, condutividade elétrica $179,0 \pm 5,0$ $\mu\text{s/cm}$ e dureza $58 \pm 1,8$ mg de CaCO_3/L (IBAMA, 1987).

Para o controle de sensibilidade dos animais foram realizados testes de toxicidade aguda com 96 horas de duração, utilizando-se como substância referência o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) com teor de pureza de 99,9% (IBAMA, 1987).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em todos os testes com três repetições e três animais por repetição de acordo com as recomendações de RAND e PETROCELLI (1985).

2.1 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA ($\text{CL} (I)_{50-96\text{h}}$) PARA O PIAUÇU (*Leporinus macrocephalus*)

2.1.1 Testes preliminares de toxicidade aguda do diquate

Os testes preliminares foram realizados com seis concentrações de diquate e o tratamento controle. Nesses testes determinou-se o intervalo de concentração de diquate que causou zero e 100% de mortalidade a ser usado nos testes definitivos (IBAMA, 1987; APHA, 1991).

2.1.2 Testes definitivos de toxicidade aguda do diquate

Para os testes definitivos avaliaram-se as concentrações de 0; 12; 18; 24; 30; 36; 42; 48; 54; e 60 mg de diquate/L. Os valores de $\text{CL} (I)_{50-96\text{h}}$ foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON, RUSSO e THURSTON, 1977).

2.1.3 Análise histopatológica da brânquia e do fígado do piauçu

Utilizaram-se cinco animais ($n = 5$) de cada tratamento para a análise histopatológica da brânquia e do fígado do piauçu. Os órgãos foram retirados e fixados em solução de Bouin por 24 horas. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina plástica (Histosec® Merck). Realizou-se corte histológico em micrótomo automático (Leica – RM-2155), obtendo secções de 3 a 5 μm de espessura que foram coradas com hematoxilina-eosina e submetidas à reação de PAS (Ácido Periódico de Schill) (BEHMER, TOLOSA e FERITAS-NETO, 1976).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TOXICIDADE AGUDA E MORTALIDADE

Obteve-se concentração letal (CL (I)_(50-96h)) para o piaçu (*L. macrocephalus*) de 34,76 mg de diquate/L, com limites inferior de 31,96 mg/L e superior de 37,81 mg/L, ajustados pela equação linear $y = 2,2778x - 32$ com $R^2 = 0,83$ (Figura 1).

O diquate mostrou-se menos tóxico que fluridona com CL (I)_{50-96h} entre 4,2 a 22 mg/L para cinco espécies diferentes de peixes (HAMELINK et al., 1986) e que o sulfato de cobre para *Morone saxatilis* com CL (I)_{50-96h} de 3,57 mg/L (REARDON e HARRELL, 1990). Também foi menos tóxico que o paraquate para *Oreochromis niloticus* com CL (I)_{50-96h} de 11,84 mg/L (BABATUNDE, OLADIMEJI e BALOGUN, 2001) e que clomazona para o *Ramdia quelen* com CL (I)_{50-96h} de 7,32 mg/L (MIRON et al., 2005).

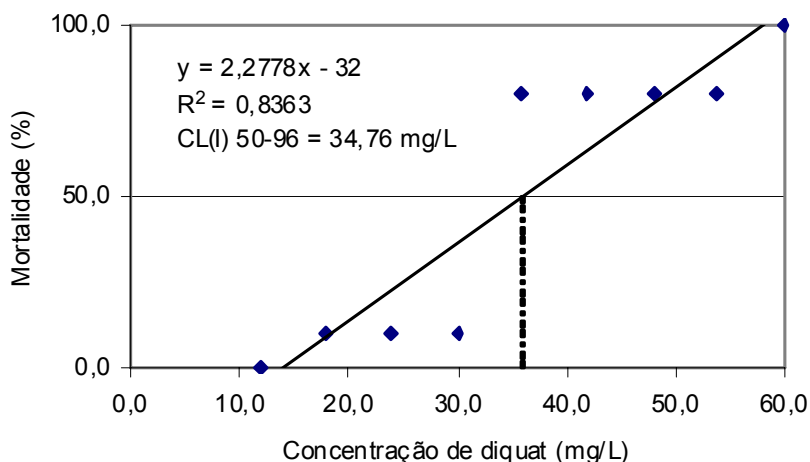
A toxicidade do diquate foi maior para *L. macrocephalus* do que para *Gambusia affinis* com CL (I)_{50-96h} de 289 mg/L (LEUNG, NAQVI e LEBLANC, 1983) e para *Carassius auratus* com CL (I)_{50-96h} de 85 mg/L (BERRY, 1984).

Comparado com outros herbicidas, o diquate foi mais tóxico que o glifosato para *Cyprinus carpio* com CL 50 (I)_(50-96h) de 620 mg/L (NESKOVIC et al. 1996), que o 2,4-D para *Tinca tinca* com CL (I)_{50-96h} de 800 mg/L (GOMEZ et al., 1998) e o quincloraque para *R. quelen* com CL (I)_{50-96h} de 395 mg/L (MIRON et al., 2005).

No Brasil, o diquate está sendo testado na concentração de 0,4 mg/L para o controle de macrófitas aquáticas submersas (RET, 793/2005). Segundo BLACKBURN e WELDON (1970) e GANGSTAD (1978), o diquate controlou *Hydrilla verticillata* nas concentrações entre 1 a 10 mg/L. TERRA et al. (2003) observaram controle de 97,7% da macrófita *Polygonum lapathifolium* seis dias após a aplicação do diquate. MARTINS, VELINI e NEGRISOLI (2005) obtiveram 100% de controle de *Egeria densa* e *Egeria najas* 31 dias após a aplicação de diquate nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mg/L.

A CL (I)_{50-96h} do diquate estimada para o *L. macrocephalus* permite classificá-lo como substância pouco tóxica para essa espécie (ZUCKER, 1985), apresentando excelente faixa de segurança entre as concentrações utilizadas para o controle de macrófitas (0,4 mg/L) e a concentração que provoca 50% de mortalidade do piaçu.

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA RELAÇÃO CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA R² DO DIQUATE (mg/L) PARA O PIAUÇU (*Leporinus macrocephalus*)



Não ocorreu mortalidade dos peixes nos tratamentos controle e com 12 mg/L, verificando-se 100% de mortalidade dos peixes no tratamento com 60 mg/L (Tabela 1).

Com 24 horas de exposição, as maiores porcentagens de mortalidade dos peixes ocorreram nos tratamentos com 42, 48, 54 e 60 mg/L (Tabela 1). Tal fato também foi observado em machos e fêmeas de *Cnesterodon decemmaculatus* expostos ao paraquate (MARZIO et al., 1998) e em larvas de *Sparus aurata* L. expostas à mistura de terbutrina-triassulfuron (ARUFE et al., 2004).

Com 48 horas de exposição alguns peixes permaneceram no fundo do aquário com intenso batimento opercular e natação não-coordenada. Após esse período, os peixes sofreram sinais de intoxicação com tremores e natação errática. O mesmo comportamento foi observado por GÓMEZ et al. (1998) em *Tinca tinca* exposto ao 2,4-D e por FERNANDEZ-VEGA et al. (2002) em *Anguilla anguilla* exposto ao tiobencarbe. Esses autores também constataram hemorragias na base da nadadeira anal, o que não ocorreu com os peixes expostos ao diquate.

TABELA 1 - PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE *L. macrocephalus* DURANTE A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO LETAL (CL (I)_(50-96h) DO DIQUATE

Concentração (mg/L)	Mortalidade (%)				
	24h	48h	72h	96h	(%) Final
0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
18	0	0	11,11	0	11,11
24	0	0	11,11	0	11,11
30	0	0	11,11	0	11,11
36	0	0	44,44	44,44	88,88
42	22,22	0	44,44	22,22	88,88
48	22,22	11,11	22,22	33,33	88,88
54	44,44	0	33,33	11,11	88,88
60	66,66	22,23	11,11	0	100,00

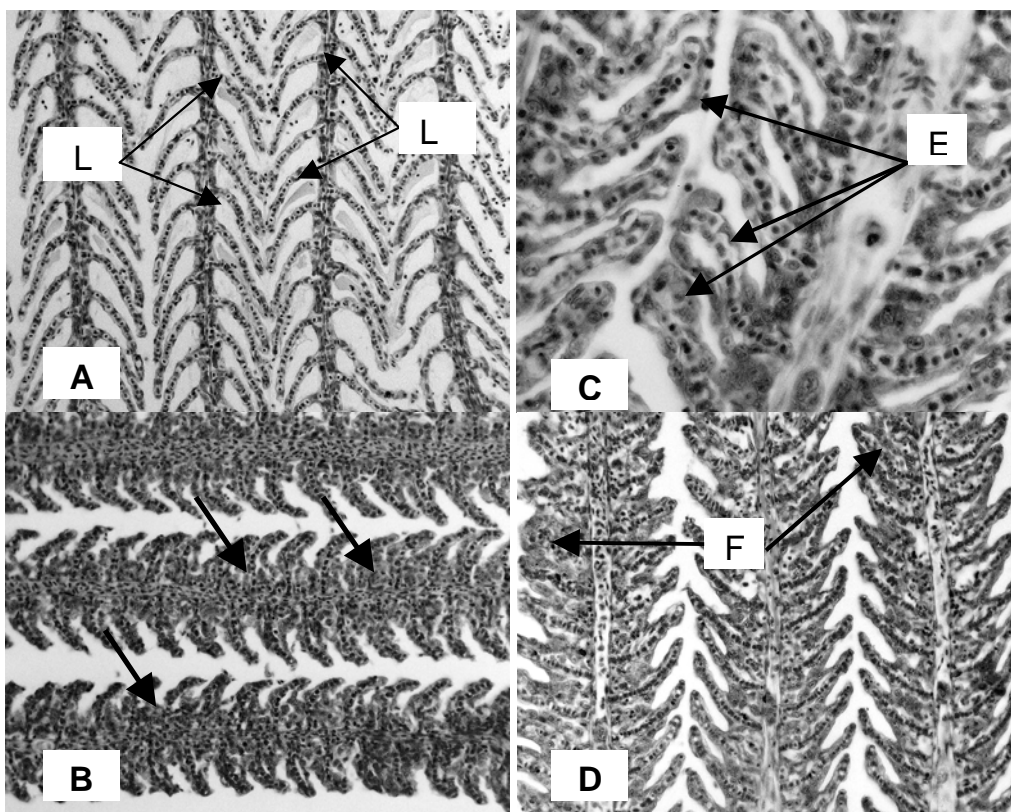
3.2 HISTOPATOLOGIA DA BRÂNQUIA E DO FÍGADO

As brânquias dos peixes dos tratamentos controle, 12 e 18 mg/L estavam constituídas por quatro arcos branquiais, dispostos em cada lado da faringe, formando as fendas branquiais. Os arcos branquiais sustentavam duas fileiras de lamelas primárias. As lamelas secundárias, dispostas acima e abaixo das primárias, estavam revestidas por epitélio estratificado que em intervalos regulares se elevava, formando as lamelas secundárias (Figura 2A). As lamelas secundárias são constituídas por duas camadas de células epiteliais pavimentosas, células pilares, células-cloreto e as células mucosas conforme descrito por SEVERI, RANTIN e FERNANDES (2000) para o *P. mesopotamicus*.

Nos tratamentos com 24, 30, 36, 42, e 48 mg/L ocorreu hiperplasia das células de revestimento, mucosas e das células cloreto no espaço interlamelar (Figura 2B). Além desses efeitos, verificou-se edema subepitelial nas lamelas secundárias (Figura 2C) nos tratamentos com 36, 42 e 48 mg/L. Essas alterações também foram observadas em *Cyprinus carpio* exposto a 5,0 e 10 mg de glifosato/L (NESKOVIC et al., 1996) e em *Oreochromis niloticus* exposto a 11,22 mg de paraquate/L (BABATUNDE, OLADIMEJI e BALOGUN, 2001). Segundo MALLATT (1985), o aumento das células mucosas provoca hipersecreção de muco que pode levar a proteção da estrutura tecidual em situações ambientais adversas e exposição à possíveis intoxicantes.

Após 96 horas de exposição verificou-se edema subepitelial e fusão apical das lamelas secundárias (Figura 2D) no tratamento com 54 mg/L. A fusão lamelar também foi observada em *Lepomis macrochirus*, após 72 horas de exposição a malationa (RICHMONDS e DUTTA, 1989). A fusão decorre do aumento da adesão entre as células epiteliais e o sistema de sustentação das células pilares, associado ao colapso da integridade da estrutura da lamela secundária (SKIDMORE e TOVELL, 1972). A fusão lamelar também foi descrita em salmão do atlântico (*Salmo salar*) e truta (*Oncorhynchus mykiss*), tratados com formalina (SPEARE et al., 1997). Segundo CENGIZ e UNLU (2002) a fusão lamelar pode constituir mecanismo de proteção do peixe, pois diminui a área de exposição das lamelas secundárias ao agente intoxicante. Assim, o piaçu pode ter desenvolvido esse mecanismo para sua proteção e integridade das lamelas secundárias e primárias.

FIGURA 2 - FOTOMICROGRAFIA DA BRÂNQUIA DE *L. macrocephalus* EXPOSTOS AO HERBICIDA DIQUATE



Em a: lamela primária (lp), lamelas secundárias (ls) do tratamento controle, he, 200x. Em b: ocorrência de hiperplasia das células de revestimento das lamelas secundárias (seta) na concentração com 24 mg/L, he, 400x. Em c: presença de edema subepitelial (e) na concentração de 42 mg/L, he, 200x. Em d: ocorrência de fusão apical (f) das lamelas secundárias na concentração de 54 mg/L, he, 200x.

Com relação ao fígado, os peixes do tratamento controle apresentaram hepatócitos com forma arredondada, citoplasma róseo (alta acidofilia), núcleo central com um ou dois nucléolos e organização cordonal das células. No citoplasma dos hepatócitos foram observados grânulos de glicogênio (PAS-positivo) e em algumas regiões do fígado o hepatopâncreas envolveu as veias centrais e os canalículos biliares revestidos por epitélio pavimentoso simples. Os sinusóides apresentaram muito sangue no seu interior (Figura 3A).

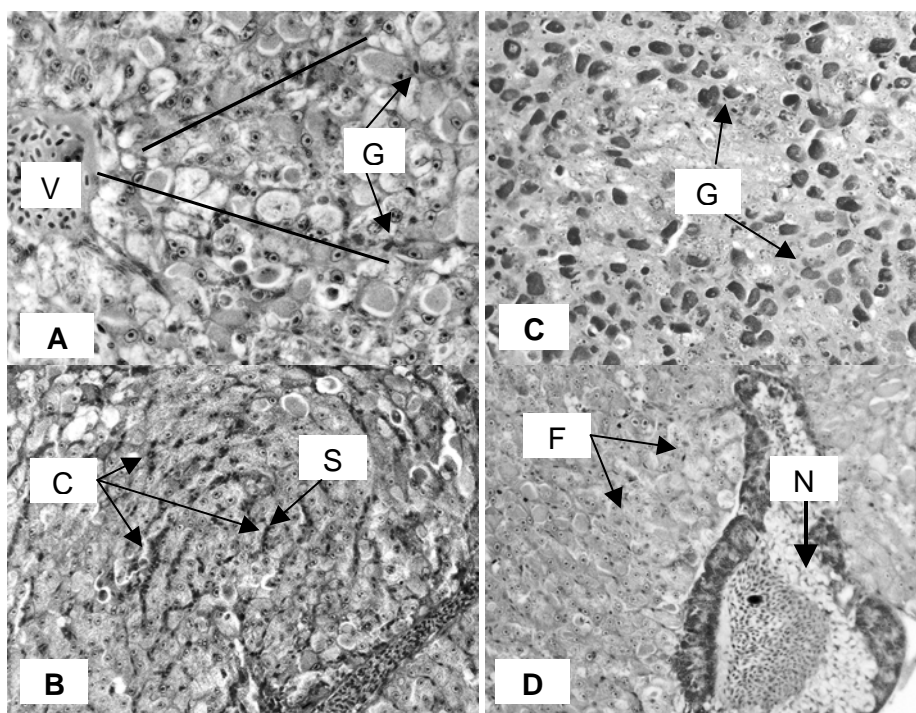
Após 96 horas de exposição, os animais tratados com 12 e 18 mg/L apresentaram estrutura do fígado semelhante ao do tratamento controle. Porém os hepatócitos com citoplasma claro em algumas regiões caracterizaram diminuição da acidofilia. Em certas regiões, a presença desses grânulos no interior da célula provocou o deslocamento do núcleo dos hepatócitos para a periferia da célula. Na concentração de 18 mg/L, em algumas regiões, ocorreu também congestão no interior dos capilares sinusóides.

Nos tratamentos com 24, 30, 36, 42, 48 e 54 mg/L, as características do fígado dos animais mostraram-se semelhantes aos dos tratados com 12 mg/L, porém com congestão mais evidente em várias regiões do órgão (Figura 3B).

A maioria dos hepatócitos nos tratamentos com 48 e 54 mg/L apresentava grânulos de glicogênio no seu interior (Figura 3C), início de necrose do hepatopâncreas, congestão no interior dos sinusóides e início de fusão celular (Figura 3D). Nesses tratamentos ocorreu o deslocamento dos grânulos de glicogênio de regiões próximas das veias centrais para o interior do hepatopâncreas com desarranjo da organização cordonal dos hepatócitos. As alterações no fígado do *L. macrocephalus* nesses tratamentos foram semelhantes às descritas por DUTTA et al. (1993) em *Heteropneustes fossilis* exposto a malationa e por FANTA et al. (2003) para *Corydoras paleatus* exposto a parationa metílica Segundo esses autores, os inseticidas organofosforados provocam mudança na granulação citoplasmática dos hepatócitos, reduzindo a eficiência do fígado e prejudicando o funcionamento de outros órgãos do peixe podendo causar a morte do animal.

As alterações que ocorreram no fígado do piauçu podem indicar a degeneração inicial dos processos intracelulares dos hepatócitos, pois o fígado exerce importantes funções no processo de desintoxicação do animal (DUTTA et al., 1993; HASCHEY e ROUSSEAU, 1996).

FIGURA 3 - FOTOMICROGRAFIA DO FÍGADO DE *L. macrocephalus* EXPOSTOS AO HERBICIDA DIQUATE



Em a: organização Cordonal dos hepatócitos (traço), grânulos de glicogênio (g) e veia central (v) do tratamento controle, reação de pas, 400x. Em b: ocorrência de congestão (c) no interior nos capilares sinusóides (s) na concentração com 36 mg/L, he, 200x. Em c: presença de grânulos de glicogênio (g) com 48 mg/L, reação de pas, 200x. Em d: início de necrose dos hepatopâncreas (n) e fusão dos hepatócitos (f) na concentração com 54 mg/L, he, 200x.

4 CONCLUSÃO

O diquate mostrou-se pouco tóxico para o *L. macrocephalus*, sendo possível considerá-lo como produto adequado para ser utilizado no controle de macrófitas aquáticas. As alterações histopatológicas que ocorreram na brânquia e no fígado dos peixes expostos são reversíveis, indicando que o diquate não apresentou efeitos severos nas concentrações subletais durante os testes de toxicidade aguda.

ABSTRACT

DIQUAT ACUTE TOXICITY AND HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS ON *Leporinus Macrocephalus's* GILLS AND LIVER

The lethal concentration LC (I) ($_{50-96h}$) and the histopathological effects of the herbicide diquat to the Brazilian fish piauçu (*Leporinus macrocephalus*) were evaluated in three experiments in laboratorial conditions. The fishes were submitted to concentrations of 0; 12; 18; 24; 30; 36; 42; 48; 54; and 60 mg of diquat/L and the gills and livers histopathology was performed on the surviving fishes. The lethal concentration LC (I) ($_{50-96h}$) was of 34.76 mg/L. In the control treatment, 12 and 18 mg/L, the fishes' gills were covered by a stratified epithelium, which in regular breaks formed the secondary lamellae constituted by two layers of epithelial squamous cells, pillars cells, chloride cell, and the mucous cell. In the treatments with 24, 30, 36, 42 and 48 mg/L, occurred a hyperplasia of the mucous membranes coating cells, and the chloride cells in the interlamellar space. In the treatment with 54 mg/L a subepithelial edema and apical fusion of the secondary lamellae were verified. The liver of the *L. macrocephalus* in the control treatment and 12mg/L presented cord-like arrangement of the hepatocytes. In the treatments with 18, 24, 30, 36, 42, 48 e 54 mg/L a congestion inside the sinusoid capillary occurred. In the treatments with 48 e 54 mg/L the presence of glycogen granules inside the cell was observed, the beginning of a necrosis of the hepatopancreas, congestion and cellular fusion. The diquate has revealed itself to be weakly toxic for *L. macrocephalus* and the histopathological alterations that occurred in the gills and liver of the fishes are reversible.

KEY-WORDS: HERBICIDE; DIQUATE; TOXICITY; HISTOPATHOLOGY; *Leporinus macrocephalus*.

REFERÊNCIAS

- 1 APHA. American Public Health Association. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 17th ed. Washington, 1991. p. 81-143.
- 2 ARUFE, M.I.; ARELLANO, J.; MORENO, M.J.; SARASQUETE, C. Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: a comparison with the Microtox test. **Ecotox. Environ. Safety**, New York, v. 59, n. 2, p. 209-216, 2004.
- 3 BABATUNDE, M.M.; OLADIMEJI, A.A.; BALOGUN, J.K. Acute toxicity of gramoxone to *Oreochromis niloticus* (Trewavas). **Water, Air, Soil, Pollut.**, Dordrecht, v. 131, n. 1-4, p. 1-10, 2001.
- 4 BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FERITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart/Edusp, 1976. 239 p.
- 5 BERRY, C.R.Jr. Toxicity of the herbicides diquat and endothal to goldfish. **Environ. Pollut.**, Barking, v. 34, p. 251-258, 1984.
- 6 BLACKBURN, R.D.; WELDON, L.W. Control of *Hydrilla verticillata*. **Hyacinth Control J.**, Vicksburg, v. 8, n. 2, p. 4-9, 1970.
- 7 CENGIZ, E.I.; UNLU, E. Histopathological changes in the gills of mosquitofish *Gambusia affinis* exposed to endosulfan. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 68, n. 2, p. 290-296, 2002.
- 8 CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Água – teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático**. São Paulo, 1999. p. 1-29.
- 9 DUTTA, H.M.; ADHIKARI, S.; SINGH, N.K.; ROY, P.K.; MUNSHI, J. S.D. Histopathological changes induced by malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Bull. Env. Contam. Toxicol.**, New York, v. 51, n. 6, p. 895-900, 1993.
- 10 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. **Ecotox. Environ. Safety**, San Diego, v. 54, n. 2, p. 119-130, 2003.

- 11 FERNANDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, San Diego, v. 72, n. 1, p. 55-63, 2002.
- 12 GARAVELLO, J.C.; BRITSKI, H.A. *Leporinus macrocephalus* sp. da bacia do rio Paraguai (*Ostariophysi, Anostomidae*). **Naturalia**, São Paulo, v. 13, p. 67-74, 1988.
- 13 GANGSTAD, E.O. Chemical control of Hydrilla. **J. Aquatic Plant Manag.**, Zattau, v. 16, p. 38-40, 1978.
- 14 GÓMEZ, L.; MASOT, J.; MARTÍNEZ, S.; DURÁN, E.; SOLER, F.; RONCERO, V. Acute 2,4-D poisoning in Tench (*Tinca tinca*): lesions in the hematopoietic portion of the kidney. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 35, n. 3, p. 479-483, 1998.
- 15 HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimmed spearman-karber method for estimating medial lethal concentrations. **Environ. Sci. Technol.**, Iowa, v. 7, p. 714-719, 1977.
- 16 HAMELINK, J.L.; BUCKLER, D.R.; MAYER, F.L.; PALAWSKI, D.U.; SANDERS, H.O. Toxicity of fluridone to aquatic invertebrates and fish. **Environ. Toxicol. Chem.**, Houston, v. 5, n. 1, p. 87-94, 1986.
- 17 HASCHEY, W.M.; ROUSSEAU, C.G. **Handbook of toxicology pathology**. London: Ed. Academic Press, 1996. p. 127-151.
- 18 HENRY, C.J.; HIGGINS, K. F.; BUHL, K.J. Acute and hazard assessment of Rodeo®, X-77 Spreader®, and Chem-Trol®, to aquatic invertebrates. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 27, n. 3, p. 392-399, 1994.
- 19 HESS, F.D. Herbicides effects on plant structure, physiology, biochemistry. In: ALTMAN, J. **Pesticides interactions in crop production beneficial and deleterious effects**. London: CRC Press, 1993. 579 p.
- 20 IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: MANUAL de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, DF, 1987. Parte D. 3.
- 21 JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E.S.; KRUAETRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POKETHITIYOOK, P. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Sci. Asia**, New Delhia, v. 28, n. 2, p. 121-127, 2002.
- 22 LEUNG, T.S.; NAQVI, S.M.; LEBLANC, C. Toxicities of two herbicides (Basagran, diquat) and an algicide (Cutrine-plus) to mosquitofish *Gambusia affinis*. **Environ. Pollut.**, London, v. 30, n. 2, p. 153-160, 1983.
- 23 MANN, R.M.; BIDWELL, R. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 36, n. 2, p. 193-199, 1999.
- 24 MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ontário, v. 42, p. 630-648, 1985.
- 25 MARCONDES, D.A.S.; VELINI, E.D.; MARTINS, D.; TANAKA, R.H.; CARVALHO, F.T.; CAVENAGHI, A.L.; BRONHARA, A.A. Eficiência do fluridone no controle de plantas aquáticas submersas no reservatório de Jupia. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, p. 69-77, 2003.
- 26 MARTINS, D.; VELINI, E.D.; NEGRISOLI, E. Controle de *Egeria densa* e *Egeria najas* em caixa d'água utilizando o herbicida diquat. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 2, p. 381-385, 2005.
- 27 MARZIO, W.D.; ALBERDI, J.L.; SAENZ, M.E.; TORTORELLI, M. Del C. Effects of paraquat (Osaquat® Formulation) on survival and total cholinesterase activity in male and female adults of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poecillidae). **Environ. Toxicol. Water Qual.**, New York, v. 13, n.1, p. 55-59, 1998.
- 28 MIRON, D.S.; CRESTANI, M.; SHETTINGER, M.R.; MORSCH, V.M.; BALDISSEROTTO, B.; TIerno, M.A.; MORAES, G.; VIEIRA, A.L.P. Effects of herbicides clamazone, quinclorac and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Ramdhia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotox. Environ. Safety**, San Diego, v. 61, p. 398-403, 2005.
- 29 NESKOVIC, N.K.; POLEKSIC, V.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; BUDIMIR, M. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 56, n. 2, p. 295-302, 1996.
- 30 PARMA de CROUX. M.J.; LOTESTE, A.; CAZENAVE, J. Inhibition of plasma cholinesterase and acute toxicity of monocrotophos in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 69, n. 3, p. 356-363, 2002.
- 31 PITELLI, R.A. Macrófitas aquáticas no Brasil na condição de problemáticas. In: WORKSHOP SOBRE CONTROLE DE PLANTAS AQUÁTICAS, 1998. Brasília. **Resumos...** Brasília: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 1998. p. 12-15.
- 32 PITELLI, R.A.; BISIGATO, A.E.F.; MARTINS, A.T.; PITELLI, R.L.C.M.; KAWAGUGHI, I. Controle de *Eichhornia crassipes* com diquate, em duas formulações aplicadas nos períodos diurno e noturno. **Boletim Inform. Soc. Brasil. Ciênc. das Plant. Daninhas**, Viçosa, v. 10, n. 10, p.111-121, 2004.

- 33 RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington: Hemisphere, 1985. 665 p.
- 34 REARDON, I.S.; HARRELL, R. Acute toxicity of formalin and copper sulfate to striped bass fingerlings held in varying salinities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 87, p. 255-270, 1990.
- 35 RET. Registro Especial Temporário 793/2005. Syngenta®. **Estudo de impacto de controle de macrófitas submersas com reward sobre algumas características de qualidade ambiental nas condições de Jupia**. Brasília: IBAMA, 2005.
- 36 RICHMONDS, C.; DUTTA, H.M. Histopathological changes induced by Malathion in gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. **Bull. Env. Contam. Toxicol**, New York, v. 43, n.1, p. 123-130, 1989.
- 37 SALAH EL-DEEN, M.A.; ROGERS, W.A. Acute toxicity and some hematological changes in grass carp exposed to diquate. **J. Aquat. Anim. Health.**, Bethesda, v.4, n. 4, p. 277-280, 1992.
- 38 SCHULTZ, I.R.; HAYTON, W.L.; KEMMENOE, B.H. Disposition and toxicokinetics of diquate in channel catfish. **Aquat. Toxicol.**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 297-310, 1995.
- 39 SEVERI, W.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N. Structural and morphology features of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) gills. **R. Brasil. Biol.**, São Carlos, v. 60, n. 3, p. 493-501, 2000.
- 40 SKIDMORE J.F.; TOVELL, P. W.A. Toxic effects of zinc sulfate on the gills of rainbow trout. **Water Research**, New York, v. 6, p. 217-230, 1972.
- 41 SPEARE, D.J.; ARSENAULT, G.; MACNAIR, N.; POWELL, M.D. Branchial lesions associated with intermittent formalin bath treatment of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Fish. Diseases.**, Oxford v. 20, p. 27-33, 1997.
- 42 SYNGENTA. Reward®. Diquate dibromide: benefits to aquatic weed management. **Technical Bulletin**. Greensboro, 2002. Disponível em: <www.syngentaprofessionalproducts.com>. Acesso em: 01 mar. 2005.
- 43 TERRA, M.A.; NEGRISOLI, E.; CARBONARI, C.A.; CARDOSO, L.R.; MARTINS, D. Controle químico de plantas aquáticas: *Polygonum lapathifolium*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, p. 85-88, 2003.
- 44 USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for the health: risk assesment guidance for superfund (RAGS)**. Washington, 2002. Disponível em:<www.epea.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7>. Acesso em: 18 fev. 2005.
- 45 VELINI, E.D. **Desenvolvimento de técnicas e equipamentos para o monitoramento e controle de plantas aquáticas**, Botucatu, 2005. 238 p. Dissertação (Livre-Docente), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- 46 ZUCKER, E. **Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for freshwater fish**. Hazard Evaluation Division. USEPA publication 540/9-85-006, Washington, 1985. Disponível em:<www.epa.gov>. Acesso em: 18 mar. 2005.