

**ESTUDO HEMATOLÓGICO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)
SUBMETIDO À CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE BIOPESTICIDA A BASE
DE *Bacillus thuringiensis***

**TAMBAQUI HEMATOLOGICAL STUDY (*Colossoma macropomum*)
SUBMITTED TO THE SUBLETAL CONCENTRATION OF BIOPESTICIDE
BASED ON *Bacillus thuringiensis***

WAGNER DOS SANTOS MARIANO¹; FRANCISCO LUÍS GOMES DE SOUSA²; MARCOS TAVARES DIAS³; RODRIGO LUSTOSA DA CUNHA RODRIGUES⁴; SAULO BORGES DE AZEVEDO²,
JEFFESSON DE OLIVEIRA LIMA²

1 – BIÓLOGO E DOUTORANDO DO PPG BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA (UNIFAP-REDE BIONORTE) E DOCENTE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS; 2- GRADUADO EM BIOLOGIA (LICENCIATURA) PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS; 3 – BIÓLOGO E PESQUISADOR DA EMBRAPA – AMAPÁ, DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA (UNIFAP/REDE BIONORTE); 4- BOLSISTA DO GRUPO PET CIÊNCIAS NATURAIS E ACADÊMICO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

wagnermariano@uft.edu.br

Resumo – O ambiente aquático é suscetível à contaminação por pesticidas, sabendo-se que inclusive a diluição destes compostos químicos pode acarretar em diversas variações na homeostase dos vertebrados aquáticos. As consequências destes agentes podem ser diretas e/ou indiretas, manifestando-se em níveis bioquímicos, fisiológicos e morfológicos do organismo, como também por reflexos estruturais na dinâmica das populações e comunidades. Deste modo o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis riscos e efeitos no tecido sanguíneo em relação ao uso de um biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* em uma espécie de peixe da bacia amazônica muito utilizada em cultivo e consumo humano – o Tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Palavras-chave: Tecido Sanguíneo, Ictiologia. Fisiologia.

Abstract - The aquatic environment is susceptible to pesticide contamination, it being understood that even the dilution of these chemical compounds can lead to several variations in the aquatic vertebrate homeostasis. The consequences of these agents can be direct and / or indirect, manifesting themselves in biochemical, physiological and morphological levels of the organism, as well as by structural reflexes in the dynamics of populations and communities. Thus, the objective of the present study was to evaluate the possible risks and effects on blood tissue in relation to the use of a biopesticide based on *Bacillus thuringiensis* in a fish species of the Amazon basin widely used in cultivation and human consumption - Tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Keywords: Blood Tissue, Ichthyology. Physiology.

I. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a agricultura mundial cresceu em produtividade e área cultivada, acompanhada pelo uso intenso de agrotóxicos, que também sofreram grandes

evoluções. Muitas moléculas novas surgiram, com características físico-químicas que propiciam funcionalidades diferenciadas e comportamentos ambientais distintos, com grandes alterações nos perfis toxicológicos e ecotoxicológicos, fruto dos avanços tecnológicos e pressões ambientalistas (ARMAS e MONTEIRO, 2005)

A busca por modos que diminuam o uso de inseticidas químicos tem sido feita em todo o mundo com a finalidade de reduzir os impactos causados ao meio ambiente por esses agentes que, além de poluir, interferem no equilíbrio ecológico possibilitando o surgimento de insetos resistentes (LIMA, 2010, p. 2)

Práticas agrícolas como o uso de variedades selecionadas e a rotação de cultivos podem reduzir grandemente a necessidade de aplicação de pesticidas sintéticos. No clássico de Rachel Carson, intitulado “A Primavera Silenciosa”, de 1972, são frisados os inúmeros danos causados pelo uso do DDT, recomendando-se a procura por soluções de cunho biológico. Anos mais tarde se constatou numerosos exemplos de substituição de pesticidas por agentes biológicos específicos (MALAJOVICH, 2012).

O exemplo mais conhecido dessa tecnologia verde compreende a uma das várias bactérias encontradas no solo, o *Bacillus thuringiensis* ou *Bt.* é utilizada como pesticida agrícola há mais de trinta anos, sem que suas toxinas tenham causado danos (aparentes¹) às pessoas, à vida silvestre ou à maioria dos insetos benéficos. Com o advento da engenharia genética foi possível transferir os genes correspondentes a várias plantas (milho, algodão, etc.) que contemporaneamente produzem diretamente a toxina inseticida (MALAJOVICH, 2012, p.128)

¹ Grifo nosso

O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) foi descrito em 1915 na Alemanha, isolado a partir de traça de farinha (*Anagastakuehniella*). Entretanto a comercialização de produtos com esta bactéria em sua composição só iniciou em 1938 na França, com o bioinseticida comercializado sob o nome de “Sporeine” (MARTINS *et al.*, 2014, p. 12).

Atualmente, há numerosos produtos à base de *Bacillus thuringiensis* comercializados com diferentes nomes (Bactcontrol, Bactur, Dipel, Ecotech Pro, Thuricide etc.) por diversas empresas nacionais e internacionais (*Vectorcontrol, Milenia, Sumitomo, Bayer, Iharabras* etc.) (MALAJOVICH, 2012).

O ambiente aquático pode ser contaminado por pesticidas ou outros xenobióticos em geral, estes últimos podem acarretar em variações diversas nos órgãos e tecidos dos peixes. As consequências destes agentes podem ser diretas e/ou indiretas, manifestando-se em níveis bioquímicos, fisiológicos e morfológicos do organismo, como também por reflexos estruturais na dinâmica das populações e comunidades (FERREIRA, 2014)

Algumas das consequências diretas dos pesticidas compreendem a necrose e a outras variações nos sistemas bioquímicos das células. As células, tecidos e órgãos são as porções com maior acometimento pelos efeitos dos xenobióticos, por estarem em contato direto com o meio aquático, como brânquias e pele. Os órgãos internos são atingidos quando o xenobiótico consegue invadir o interior do animal. Deste modo, a homeostase é perturbada, seguida de alterações diversas, agravando o quadro do ser contaminado. Os efeitos indiretos estão relacionados ao estresse desencadeado pelo agente químico. (WENDELAAR BONGA, 1997; FERREIRA, 2014)

Após levantamento bibliográfico, foi possível perceber que ainda não são conhecidas as prováveis influências e consequências que o biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* pode causar para a fauna aquática (especificamente peixes), mesmo diante da crescente utilização de defensivos agrícolas nas culturas vegetais de produção.

O gênero *Colossoma* (Characidae) é amplamente distribuído na América do Sul. Na Bacia Amazônica, inclusive, o *Colossoma macropomum* é o segundo maior peixe em escala, perdendo apenas para o Pirarucu (*Arapaima Gigas*)(GOMES, et al., 2005). O tambaqui é um dos peixes mais comercializados nos mercados dos centros urbanos da região norte desde o final do século XIX, a preços desejáveis com demanda ainda crescente, devido ao aumento das populações consumidoras e diminuição dos estoques naturais da espécie nos arredores de grandes cidades amazônicas como Manaus. (VERISSIMO, 1895; GOULDING, 1982; INOUE, 2014). Deste modo o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis riscos e efeitos no tecido sanguíneo em relação ao uso de um biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* em uma espécie de peixe da bacia amazônica muito utilizada em cultivo e consumo humano – o Tambaqui (*Colossoma macropomum*).

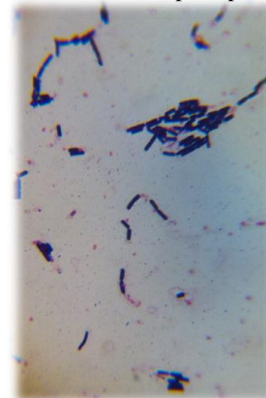
II. PROCEDIMENTOS

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados exemplares de tambaquis, *Colossoma macropomum*, obtidos em piscicultura no Município de Araguaína/TO. Os espécimes utilizados (N=8) nos testes eram juvenis, com tamanhos variados, entre 15 e 25 cm e, apresentando peso médio de 110g. Estes foram mantidos no Laboratório

multiuso da Universidade Federal do Tocantins, Campus Araguaína, acondicionados em três tanques de 150 l cada um, em laboratório climatizado $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante todo o período de aclimação e durante os experimentos. Para eliminar excretas e sujeiras dos aquários 50% do volume total da água eram substituídas a cada 48h, com aeração artificial constante. Os peixes foram submetidos a um tempo de aclimação por 45 dias, com temperatura em torno de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo natural, sendo alimentados a cada seis horas com ração comercial contendo 40% de proteína na sua constituição. Os parâmetros de qualidade da água, como o nível de pH e oxigênio dissolvido, foram constantemente monitorados durante este período.

O biopesticida utilizado para o estudo foi o DiPel® WP a base de *Bacillus thuringiensis*, var. *kurstaki*, linhagem HD-I 16.000 Unidades Internacionais de Potência por MG (mínimo de 25 bilhões de esporos viáveis por grama) 32,0 g/kg (3,2 % m/m) (Fig.1)

Figura 1 - *Bacillus thuringiensis* cultivado a 35°C em estufa microbiológica por 24 horas a partir do biopesticida (DiPel®) em ágar Mueller Hinton. Microscopia Óptica ampliada 100x.



Fonte: Mariano, W. S, 2015

Desenvolveu-se um teste preliminar para a determinação da concentração subletal do biopesticida, para então, a partir deste ser calculado o valor da concentração definida a ser utilizada nos exemplares em estudo.

Para a primeira fase do experimento, os animais foram subdivididos em cinco grupos (N=8), conforme a Figura 2, sendo que cada grupo foi mantido em aquários separados. A exposição dos peixes ao pesticida se deu por 24 e 48 horas.

Figura 2 - Fluxograma descrevendo o desenho experimental dos diferentes grupos, expostos por um período de 24h e 48 h ao pesticida. Grupo Controle (GC); Grupo Experimental Água 24h (GEA24); Grupo Experimental Água 48 h (GEA 48); e Grupo Experimental Ração 24h (GER24) Grupo Experimental Ração 48h (GER48).



Fonte: Autores, 2016.

Foram adotados dois diferentes procedimentos, para a contaminação dos grupos experimentais. Para a contaminação do GEA (Grupo Experimental Água) foram diluídos 1,4g do biopesticida DiPel® WP a base de *Bacillus thuringiensis* em 40 ml de água retirada do aquário e, posteriormente, despejados lentamente ao tanque de origem. Para a contaminação alimentar (GER), foi utilizado a mesma dosagem e diluição citada acima. Foi embebido 100g de ração no produto diluído anteriormente, utilizou-se um Becker de 1 L. Após a absorção, o alimento ficou por 12 h em estufa microbiológica a 35°C.

Concluídas as etapas de exposição (24 e 48 h, via água e via ração), foram extraídas amostras sanguíneas de oito animais aleatórios de cada tanque (grupo) através de punção da veia caudal.

As análises efetuadas consistiram nas mesmas para todos os cinco grupos experimentais, sendo estas: hematócrito (Hct), dosagem de hemoglobina (Hb) e uma alíquota do sangue para a contagem de eritrócitos (RBC).

O hematócrito (Hct=%) foi determinado em duplicatas utilizando o método de microhematócrito com tubo capilar heparinizado. O sangue foi centrifugado durante 5 minutos a 12000 rpm em uma centrífuga de microhematócrito. A proporção entre a parte sólida (eritrócitos e leucócitos) e líquida (plasma) do sangue de cada amostra foi estimada com o auxílio de um cartão padronizado e o valor para cada animal foi considerado como média das duas determinações.

Para a contagem de eritrócitos (RBC= número de eritrócitos mm⁻³) 10µl de sangue recém coletado foram diluídos em formol citrato (2 mL) e a contagem foi efetuada em uma câmara de Neubauer em duplicata. O valor médio foi multiplicado por 10.000 e o resultado foi expresso em mm³.

A concentração de hemoglobina ([Hb] = g/dL) foi determinada a partir de amostras de 10 µl de sangue total segundo o método de formação de cianometahemoglobina utilizando o reagente de Drabkin. Após agitação a solução diluída permaneceu em repouso por 15 minutos para que ocorresse a hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de acrílico e a leitura foi efetuada em 540 nm em um espectrofotômetro.

Nas análises de resultados, foram utilizados os Índices Hematimétricos (conforme sugerido por RANZANI-PAIVA et al., 2013). Os resultados obtidos estão apresentados como média ± DP (Desvio Padrão da Média). O teste de Bartlett foi utilizado para determinar a homogeneidade dos dados e definir a aplicação de testes paramétrico ou não paramétrico às variáveis analisadas. A análise de variância ANOVA seguida do pós-teste Dunnett's (paramétrico) foi utilizada em todos os dados após sugestão do teste Bartlett. Toda a Análise estatística foi efetuada com nível de significância de 95% (p < 0,05) utilizando o programa estatístico GraphPad InStat.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Jonsson e colaboradores (2014) fizeram uma avaliação de risco do biopesticida *Bacillus thuringiensis* (Bt) em organismos de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar presentes em sistemas de produção. Neste estudo a espécie de peixe testada foi *Hypophessobrycon scholzei* (Characidae) e os resultados demonstram que durante 7 dias de exposição ao Bt não houve mortalidade, corroborando com os dados encontrados no presente estudo, onde nenhum peixe morreu durante os experimentos (24 e 48 horas) com exposição

biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* (DiPel®), inicialmente os peixes apresentaram maior movimentação perdurando por mais ou menos 10 minutos, após esse período os peixes voltaram a movimentação normal, semelhante ao do grupo controle.

Jonsson et al., (2014), porém, salientam que a partir da segunda semana de experimentação houve um aumento na taxa de mortalidade (2%), o que não ocorreu neste estudo pois o período máximo de exposição ao biopesticida foi de dois dias (48h).

A hematologia é uma das partes essenciais da toxicologia, onde todas as ciências podem ser integradas e avaliadas para determinar os riscos para a saúde animal e para o ambiente (EVANS, 2008). Por compreender que os ajustes sanguíneos são os primeiros a responderem a situações de estresse, principalmente por contaminação, escolheu-se esse mediador fisiológico para testar os riscos da interação de um biopesticidas com um tipo de vertebrado aquático.

O hematócrito acompanha o aspecto evolutivo do peixe. Menores valores ocorrem em peixes mais primitivos na escala evolutiva, nos de ambientes lênticos, nos sedentários e nos bentônicos. Já os maiores valores ocorrem em espécies marinhas pelágicas e ativas. A hemoglobina é composta de duas partes principais, a globina e a unidade heme. Essa última é idêntica em todas as espécies de peixes até agora estudadas, mas a proteína globina difere de espécie para espécie (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

A hemoglobina (Hb) e o hematócrito (Hct), como a contagem de eritrócitos (RBC), variam conforme a espécie de vertebrado, além disso conforme idade, sexo, ambiente, estado fisiológico e de sanidade. Os dados a seguir apresentarão os níveis de Hb e de Ht de tambaqui submetido a concentração subletal de um biopesticida a base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), conforme desenho experimental anteriormente apresentado.

Os valores médios de Hct (Figura 4) e Hb não demonstraram aumento significativo (p<0,05) durante a exposição seja em 24 ou 48 h, tanto nos grupos expostos por ração como em água (GER24; GER48; GEA24 e GEA48).

Apesar dos valores demonstrarem possíveis alterações no hematócrito e hemoglobina, todos os grupos são semelhantes estatisticamente. Isso demonstra que o efeito do biopesticida sobre o percentual do hematócrito e a dosagem da hemoglobina não demonstrou alteração em nenhum desses parâmetros. Swendson (1996) comenta que o hematócrito é expresso como um volume percentual das células empilhadas no sangue total após a centrifugação e a maioria das espécies de animais domésticos tem hematócrito variando entre 38 e 45 % com média de 40%. Os valores do hematócrito no grupo controle (GC) foi de 19,8%, abaixo do encontrado na literatura para essa mesma espécie. Hilbig et al., (2010) obteve valores entre 41 a 44 % em peixes alimentados em diferentes taxas de alimentação. Rocha (2009) submeteu a *Colossoma macropomum* a um pesticida químico (triclorfon) e o percentual de hematócrito e a dosagem de hemoglobina também não apresentaram diferença do grupo controle.

Os níveis de hemoglobina do grupo controle (GC) foi de 12,38 (g/dL) para cerca de 19,31 após 24 h de exposição do GER24 e 17,98 após 48 h do GER 48. Apesar de não demonstrar diferença estatística é possível vislumbrar um delineamento numérico que pode ter sido mediado por ajustes fisiológicos para transpor o período inicial da

exposição ao biopesticida. Os valores do GEA seguiram semelhante ao do GER, tanto em 24 como em 48h. A concentração da hemoglobina do grupo não submetido ao biopesticida (GC) foi semelhante ao encontrado por Hilbig (2010).

A respeito dos valores médios (\pm E.P.M) da contagem de eritrócitos (RBC = número de eritrócitos mm^{-3}) de *Colossoma macropomum* (n = 8) durante exposição ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* (DiPel®), foi possível verificar que os dois grupos contaminados via alimentação – GER 24 e GER48, diferenciaram do grupo controle. O grupo GER 48 demonstrou diferença quando comparado com o grupo contaminado pela água durante 24 horas - GEA 24. O grupo GEA 24 diferenciou do grupo GEA 48.

A qualidade de eritrócitos reduziu significativamente tanto após 24h de exposição ao biopesticida pela ração (de 2,08% [GC] para 1,3 em GER e 0,66 em GEA) como pela água. Apesar de o tratamento estatístico não sinalizar diferença entre hematócrito e hemoglobina é possível verificarmos tendência de alteração quando compararmos os índices numéricos. Analisando os resultados é possível compreender que essa redução na quantidade de células vermelhas (eritrócitos) foi resolvida pelo aumento do volume destas células uma vez que “numericamente” o percentual do hematócrito e a dosagem de hemoglobina aumentaram. As informações do Volume Corpuscular Médio (VCM) e da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) corroboram com essa hipótese uma vez que ambas demonstraram aumento no volume da célula como na concentração de hemoglobina aderida aos eritrócitos, considerando que o Volume Corpuscular Médio (VCM) é a relação que existe entre o volume globular obtido (hematócrito) e o número de eritrócitos (VERRASTRO, 1998) e permite avaliar o volume dos eritrócitos (RANZANI-PAIVA et al., 2013)

Quanto aos valores médios (\pm E.P.M) do Volume Corpuscular Médio (VCM) de *Colossoma macropomum*, verificou-se após tratamento estatístico que o grupo contaminado via água (24 h) diferenciou do grupo controle. Já o grupo contaminado por 24 horas via ração diferenciou do grupo contaminado via água no mesmo período. Já o GER48 (48 horas de exposição ao biopesticida via ração) demonstrou diferença entre o grupo GEA -24. O grupo GEA 24, por sua vez, diferenciou-se do grupo GEA 48.

Os dados demonstram que o volume dos eritrócitos não apresentou alteração nos grupos experimentais submetidos ao biopesticida via alimento (ração). Já nos grupos submetidos diretamente na através da água, o volume dos eritrócitos aumentou significativamente. Assim, é possível sugerir que o biopesticida dissolvido diretamente na água apresenta-se mais agressivo promovendo um estresse agudo.

Quanto aos testes de Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), foi possível verificar após tratamento estatístico que o grupo controle (GC) se diferenciou do grupo contaminado via água, após 24 horas de contaminação e do grupo contaminado via ração contaminado após 24 horas. Já o grupo contaminado via ração por 48 horas diferenciou-se do grupo GEA 24.

CHCM está relacionada à concentração do pigmento hemático nos eritrócitos (RANZANI-PAIVA, et al., 2013). Durante exposição ao biopesticida a base de *Bacillus*

thuringiensis (DiPel®), após tratamento estatístico, nenhum grupo apresentou diferença significativa.

IV- CONCLUSÃO

O presente estudo sugere que o biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis* na concentração (1,4g para um aquário de 140 litros) testada não chega a trazer sérios danos ao tecido sanguíneo da espécie de peixe Tambaqui (*Colossoma macropomum*), visto que as pequenas alterações apresentadas foram seguidamente neutralizadas pelos próprios ajustes fisiológicos. Outra informação que podemos salientar é que nenhum peixe morreu durante o desenvolvimento do experimento (48 horas), logo essa concentração pode ser considerada sub-letal para esta espécie. Os dados apresentados são preliminares, análises das células brancas sanguíneas (contagem diferencial de leucócitos) e bioquímicas serão estudadas e apresentadas em momento oportuno.

Outros estudos, com diferentes concentrações e em outras espécies devem ser largamente testados antes de se ter a confirmação da não nocividades dos biopesticidas a base de *Bacillus thuringiensis* com vertebrados aquáticos.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R. Uso De Agrotóxicos Em Cana-de-Açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o Risco de Poluição Hídrica. In: **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 6, 975-982, São Paulo, 2005.

EVANS, G. O. Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical. USA: **CRC Press**, 222p. 2008.

FERREIRA, B. B. Toxicidade e Efeitos do Pesticida Atrazina Sobre a Frequência de Células Mucosas na Epiderme do Lambari, *Astyanax altiparanae*. Fundação Universidade Federal do Tocantins, Araguaína. 2014.

GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; MARTINS-JUNIOR, H.; ROUBACH, R.; AKIFUMI E. O.; LOURENÇO J. N. P. Cage culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a central Amazon floodplain lake. **Aquaculture**. 2006 Mar [cited 2014 Sep 22]; 253(1-4): 374-384. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848605005442>

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life History And Management Of The Tambaqui (*Colossoma Macropomum*, Characidae); An Important Amazonian Food Fish. In: **Revista Brasileira de Zoologia**, ed. 1(2), p. 107-133, São Paulo, 1982.

HILBIG, C. C.; et al. Hematologia do Pacu criado em tanques-rede submetido a diferentes taxas de alimentação. **II Simpósio Nacional de Engenharia de Pesca**. 2010.

INOUE, L. A. K. A.; et al. Cultivo de Tambaqui em Gaiolas de Baixo Volume: Efeito da Densidade de Estocagem na Produção de Biomassa. In: **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.4, p. 437-443, Goiânia, 2014.

JONSSON, C. M; MAIA, A. H. N.; CAPALBO, D. M. F. Avaliação de risco do biopesticida *Bacillus thuringiensis* (CEPA 344) em organismos bioindicadores presentes em sistemas de produção aquícola. 2014. Disponível em: file:///C:/Users/WAGNER/Downloads/AVALIA_O_DE_RISCO_DO_BIOPESTICIDA_Bacillus_thuringiensis_C

EPA_344_EM_ORGANISMOS_BIOINDICADORES_PR
ESENTES_EM_SISTEMAS_DE_227408380.pdf

LIMA, G. M. S. Proteínas Bioinseticidas Produzidas por *Bacillus thuringiensis*. In: **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 7, p. 119-137, 2010.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MARTINS, A. L.; VIVAN, R. H. F.; SANTOS, F. P. Caracterização Genética de Novos Isolados Bacterianos com Potencial Entomopatogênico. **Revista Terra & Cultura**, 58: 11-18, 2014

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; et al. Métodos para análise hematológica em peixes. **Editora da UEM**, 137P. Maringá, 2013.

ROCHA, A. S. Toxicidade aguda e subaguda do triclorfon em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Dissertação de Mestrado**, 66p. UFT, Araguaína, 2009.

TAVARES-DIAS, M & MORAES, F. R. Hematologia de Peixes Teleosteos. FMRP-USP, Ribeirão Preto, 144p. 2004.

VERISSIMO, J. A pesca na Amazônia. Livraria Clássica de Alves, Rio de Janeiro, 1895.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; NETO, S. W. Hematologia e Hemoterapia – Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. **Atheneu**, São Paulo, 301p. 1998.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. In: **Physiological Reviews**, v.77, p.591-625, 1997.

VI. COPYRIGHT

Direitos autorais: Os autores são os únicos responsáveis pelo material incluído no artigo.

VII. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido CNPq – Chamada 081/2013, processo nr. 487639/2013-8