

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOXIDADE AGUDA DO TRICLORFOM EM PACUS JUVENIS
(*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887)**

Maria Isabel Mataqueiro
Bióloga

Jaboticabal – São Paulo - Brasil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TOXIDADE AGUDA DO TRICLORFOM EM PACUS JUVENIS
(*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887)**

MARIA ISABEL MATAQUEIRO

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira**

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Aqüicultura, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor – Área de Concentração em Aqüicultura .

Jaboticabal
2006

M425t Mataqueiro, Maria Isabel
Toxicidade Aguda do Triclorfom em pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) / Maria Isabel Mataqueiro. -- Jaboticabal, 2006
vii, 57 f.:il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da UNESP, 2006
Orientadora: Laura Satiko Okada Nakaghi
Banca examinadora: Sergio Fonseca Zaiden, Elisabeth Criscuolo Urbinati, Antonio de Queiroz Neto, Lúcia Helena Vasques
Bibliografia

1. Peixe. 2. Organofosforado. 3. Acetilcolinesterase. I. Título. II. Jaboticabal- Centro de Aqüicultura da UNESP.

CDU 639 . 31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

E' dura diventare specialisti in cromatografia....



Autor desconhecido

DEDICO.....

A DEUS que está dentro de cada um de nós, pronto a dar-nos energia e vigor, ânimo e incentivo.

Aos meus queridos pais,

LUIZ E LUIZA que constituíram uma família com muita dedicação, amor e sacrifício.

À minha filha, LIVIA, por todo infinito amor e carinho .

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, um agradecimento especial pela amizade, confiança, incentivo e orientação durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira, meus agradecimentos pela co-orientação neste trabalho e a oportunidade que me proporcionou com o estágio realizado no Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da UNESP – Araraquara.

Ao Prof. Dr. Antonio de Queiroz Neto e Prof. Dr. Edanir dos Santos, pela amizade e alegre convivência durante muitos anos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal e aos professores, funcionários e alunos de pós-graduação do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Unesp-Jaboticabal e da Faculdade Ciências Farmacêuticas, Unesp – Araraquara que participaram de alguma forma neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flavio e a todos os funcionários do CAUNESP, que de alguma forma, prestaram serviços durante a condução deste trabalho.

A Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati e sua equipe (Ana, Damares, Eduardo, Fabiano, Janessa, Leo, Luciana, Márcio, e Roquinho) pela indispensável colaboração na condução do experimento.

Aos meus amigos Claudinei, Orandi, Patrícia (Tissa), Jaqueline, equipe Lauretis: Camila, Verônica, Fernanda, Maria, Lílian, Erico, Francini, Daniela (1 e 2), Leila, Érika pelo auxílio prestado na condução do experimento.

Aos meus amigos Cidinha, Zezé, Michele, Raquel, Matheus, Agnaldo, Anselmo, D.Santa, Sr. Nininho, Piriquito, Pelé, Má, Mário e família Zanella pelo companheirismo e incentivo.

A todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, com maior ou menor intensidade: Anelize, Camilo, Carolina (Argentina), Daniel (estatística), Érika, Natalia, Rossineide, Tiêko (Biblioteca), Veralice, Michele, Waldecir e todas as pessoas que porventura não foram citadas.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1..... | 1 |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS | 1 |
| 1- Introdução | 2 |
| 2- Objetivos | 3 |
| 3- Revisão De Literatura | 3 |
| 4- Referenciais Bibliográficas | 10 |
| CAPÍTULO 2 | 13 |
| ATIVIDADE DA CLONITESTERASE E DETREMINAÇÃO RESIDUAL DE TRICLORFOM EM PLASMA DE PACU (<i>Piaractus mesopotamicus Holmberg 1887</i>) | |
| RESUMO..... | 14 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3. RESULTADOS | 25 |
| 4. DISCUSSÃO | 32 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |
| CAPÍTULO 3 | 38 |
| HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO, RIM E BRÂNQUIAS DE PACU (<i>Piaractus mesopotamicus Holmberg 1887</i>) EXPOSTO À CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE TRICLORFOM | |
| RESUMO | 39 |
| ABSTRACT | 40 |
| 1. INTRODUÇÃO | 41 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 3. RESULTADOS | 45 |
| 4. DISCUSSÃO | 51 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|---|--------|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| FIGURA 1- ESQUEMA GERAL DO CROMATÓGRAFO CG | 4 |
| FIGURA 2- PICOS DE UMA CROMATOGRAMA | 4 |
| TABELA 1- TOXICIDADE AGUDA DO TRICLORFOM PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS | 8 |
| CAPÍTULO 2 | 13 |
| ATIVIDADE DE COLINESTERASE E DETERMICAÇÃO RESIDUAL DE TRICLORFOM EM PLASMA DE PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg 1887) | |
| FIGURAS 1- ATIVIDADE DA COLINESTERASE (UM/min/G) NO CERÉBRO DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> EXPOSTO A TRICLORFOM ADICIONADO NA ÁGUA | 25 |
| TABELA 1- VALORES MÉDIOS E ERRO PADRÃO DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE ($\mu\text{m}/\text{min}/\text{g}$) NO CÉREBRO NOS DIAS DE EXPOSIÇÃO X CONCENTRAÇÕES | 26 |
| FIGURA 2- ATIVIDADE DA COLINESTRASE (Um/min/g) NO PLASMA DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> EXPOSTO A TRICLORFOM ADICIONADO NA ÁGUA | 27 |
| TABELA 2- VALORES MÉDIOS E ERRO PADRÃO DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE ($\mu\text{m}/\text{min}/\text{g}$) NO PLASMA NOS DIAS DE EXPOSIÇÃO x CONCENTRAÇÕES | 27 |
| FIGURA 3- CROMATOGRAFIA TÍPICO DA CURVA DA CALIBRÇÃO DO TRICLORFOM E LINDANE COMO PADRÃO INTERNO | 28 |
| FIGURA 4- CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DETECTOR PARA LINEARIDADE DE RESPOSTA À DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO TRICLORFOM | 29 |
| FIGURA 5- CROMATOGRAMA TÍPICO DA RECUPERAÇÃO DO TRICLORFOM E LINDANE COMO PADRÃO INTERNO | 30 |
| FIGURA 6- CURVA DE RECUPERAÇÃO DO TRICLORFOM NO PALSMA USANDO COMO PADRÃO INTERNO O LINDANE..... | 30 |
| TABELA 3 – VALORES DA RECUPERAÇÃO ABSOLUTA DO TRICLORFOM EM PLASMA DE PACU..... | 31 |

| | |
|---|----|
| TABELA 4 -VALORES DA RECUPERAÇÃO RELATIVA DO TRICLORFOM EM PLASMA DE PACU..... | 31 |
| FIGURA 7 – CURVA DE DISSIPAÇÃO DO TRICLORFOM NA ÁGUA COLETADA DAS CAIXAS DOS TRATAMENTOS 0,025; 0,05 E 0,1 mg/L..... | 32 |
| | |
| CAPÍTULO 3 | 38 |
| HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO, RIM E BRÂNQUIAS DE PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg 1887) EXPOSTO À CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE TRICLORFOM | |
| | |
| FIGURA 1 – FOTOMICROGRAFIA DE FÍGADO DE PACU (HE)..... | 48 |
| | |
| FIGURA 2 – FOTOMICROGRAFIA DE RIM DE PACU (HE)..... | 49 |
| | |
| FIGURA 3 – FOTOMICROGRAFIA DE BRÂNQUIAS DE PACU (HE)..... | 50 |

Capítulo 1
CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o uso praticamente global de praguicidas, desde o “spray” doméstico até as toneladas de produtos utilizados anualmente na agricultura e na pecuária, constitui problema de impacto ambiental e de saúde pública e animal.

Os praguicidas estão presentes em muitos ambientes e, no meio rural, é comum que parte da quantidade utilizada para fins diversos, atinja as águas de pequenos regatos, lagos e rios. Os seus efeitos sobre a vida aquática podem ser devastadores, causando intoxicações maciças ou insidiosas, pois podem permanecer na natureza durante longo tempo, e por isso são muito perigosos para a saúde pública. Os praguicidas ou defensivos agrícolas ou agrotóxicos, como substâncias químicas que são, podem modificar a fisiologia normal dos organismos vivos. O seu uso deve ser parcimonioso pelos efeitos adversos que os mesmos podem causar nos organismos aquáticos e no meio ambiente. Com relação à estrutura química dos mesmos, podem ser classificados em organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides e outros.

Os organofosforados são extremamente tóxicos para peixes e outros organismos aquáticos, que podem sofrer efeitos após curta ou prolongada exposição ao praguicida. A gravidade da exposição dos peixes e outros animais ao praguicida no meio ambiente depende da bioconcentração e tempo de exposição ao produto que, por sua vez, depende da sua persistência no ambiente, gerando maior ou menor risco de intoxicação para os seres vivos.

Como os organofosforados, de maneira geral, não apresentam longa persistência em ambiente aquático, são utilizados no controle de ectoparasitos de peixes. Entretanto, dada sua alta toxicidade, inclusive para indivíduos não alvo, justifica-se trabalhos científicos que busquem a otimização do controle destes ectoparasitos sem alterar a homeostase do peixe.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- a) Estimar a concentração letal (CL_{50-96h}) do triclorfom em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*);
- b) Determinar a atividade da colinesterase do cérebro e plasma de pacu, na vigência da ação do triclorfom;
- c) Determinar a concentração residual do triclorfom no sangue do peixe até 15 horas após exposição ao composto por meio de cromatografia de fase gasosa;
- d) Avaliar as alterações histopatológicas do fígado, rim e brânquias do pacu provocadas pelo triclorfom nas diferentes concentrações.

O presente trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, em reunião de 31 de agosto de 2004.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cromatografia em fase gasosa

Segundo COLLINS & BRAGA (1987), a cromatografia pode ser definida como um método físico-químico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma das quais é estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa).

A amostra, através de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização destas substâncias, que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, serão retidas por tempos determinados e chegará a saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação dessas substâncias. Segundo CIOLA (1973), o esquema básico de um cromatógrafo a gás (Figura 1) apresenta os dispositivos constantes de legenda:

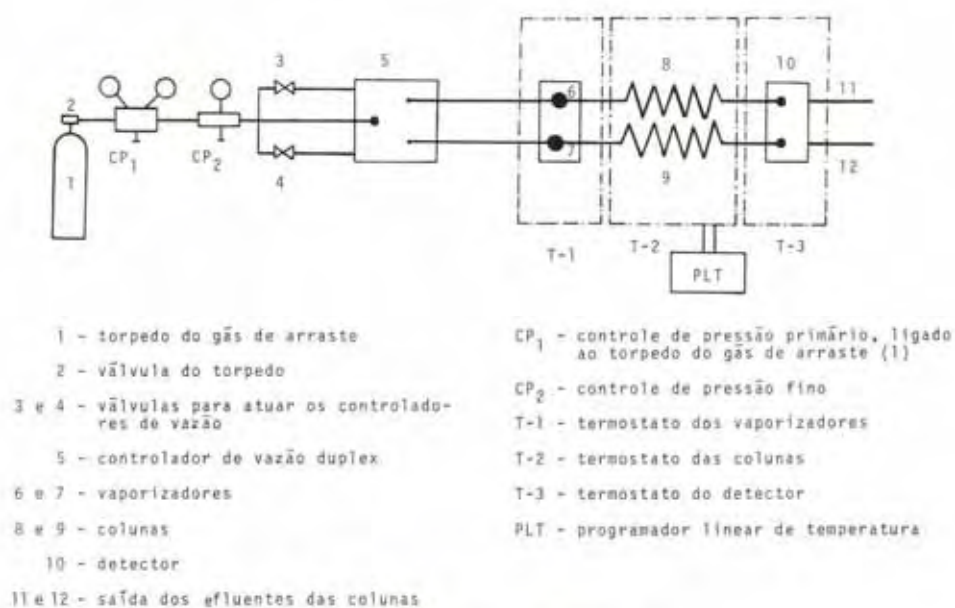


Figura 1 Esquema geral do cromatógrafo CG - 25 CIOLA (1973)

Os componentes eluídos da coluna são detectados pelo detector e o sinal é enviado ao processador de dados, obtendo-se o cromatograma (Figura 2):

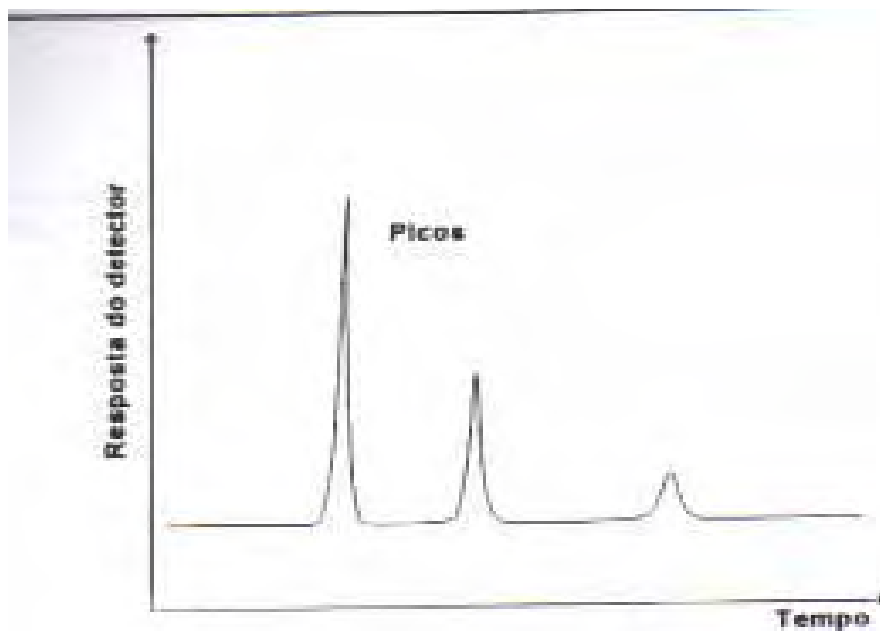


Figura 2. Picos de um cromatograma.

COLLINS & BRAGA (1987) relatam que em cromatograma ideal, os picos apresentam-se separados e simétricos. A assimetria frontal está relacionada com um excesso de amostra injetada ou com o uso de colunas em uma temperatura abaixo do ideal para uma determinada análise.

É necessária uma identificação positiva pelo uso de padrões, os quais são injetados sob as mesmas condições para se determinar o tempo de retenção, devendo ser iguais aos componentes da amostra a ser analisada. Tempo de retenção igual, somente é possível em condições idênticas (temperatura, velocidade do gás, coluna, etc.). A partir do momento em que a substância é injetada e emerge da coluna, passando pelo detector, o tempo é registrado e denominado tempo de retenção daquela substância. Obviamente, se uma boa separação dos componentes foi obtida, então cada componente terá o seu tempo de retenção característico. Portanto, o tempo de retenção do pico é utilizado na determinação qualitativa, comparando-o com aquele da amostra-padrão.

3.2. A importância dos organofosforados para a aquicultura

Na piscicultura, os peixes estão constantemente sujeitos ao ataque de predadores ou parasitos que prejudicam o crescimento e provocam mortalidade. Os insetos aquáticos são considerados os predadores mais importantes das larvas de peixes, em condições de criação, destacando-se as naiades da ordem Odonata, indicadas como responsáveis por altas taxas de mortalidade larval (GARÁDI et al., 1988). Para o tratamento, geralmente são aplicados os organofosforados (STRAUSS & CHAMBERS, 1995; CARR & CHAMBERS, 1996).

As medidas preventivas e corretivas para a preservação e proteção da flora e da fauna aquáticas baseiam-se em estudos ecotoxicológicos, por meio dos quais são estabelecidos limites aceitáveis de poluentes na água. Esses estudos devem ser conduzidos para avaliar os efeitos tóxicos dos defensivos agrícolas em peixes além de controlarem os parasitos, estas substâncias podem causar efeitos tóxicos nos hospedeiros (ZAGATTO & GOLDSTEIN, 1991).

A utilização de testes ecotoxicológicos, tem se consolidado como importante ferramenta para a compreensão de impactos provocados por agentes químicos nas comunidades biológicas (ZAGATTO & GOLDSTEIN, 1991). Os testes ou ensaios de toxicidade expõem os indivíduos testes com controle rigoroso das condições ambientais (temperatura e parâmetros físico-químicos da água), sendo seus efeitos (mortalidade, distúrbios morfológicos) avaliados por meio da comparação com o tratamento controle (RAND & PETROCELLI, 1985).

3.3. Uso do triclorfom em aqüicultura

O triclorfom é usado para o controle de parasitos e pode ser tóxico aos peixes. Existe uma grande variedade de parasitoses de peixes em função da espécie e variabilidade individual. O Dipterex (triclorfom) seleciona o zooplâncton e elimina as odonatas, matando os copépodes e cladóceros, sobrevivendo os rotíferos que são alimentos indispensáveis às pós-larvas (GARÁDI et al., 1988). O Triclorfom é usado também para erradicar ectoparasitos como trematódeos, piolhos e copépodes em uma gama extensiva de espécies de peixes (JUAREZ & ROUSE, 1983).

O tratamento com triclorfom pode ser feito com banhos em concentrações altas para um período curto de tempo. Às vezes, as concentrações efetivas usadas podem ser tão altas, que acabam por matar muitos peixes durante o tratamento. Contudo, o tratamento de ectoparasitos de peixes com baixas concentrações efetivas do praguicida controla o parasita sem matar os peixes (FLORES-NAVA & VIZCARRA-QUIROZ, (1988).

3.4 Toxicidade do triclorfom para peixes e outros organismos aquáticos

O triclorfom, como todos os organofosforados, altera a fisiologia dos peixes inibindo a acetilcolinesterase (AchE) presente nas sinapses colinérgicas, o que impede a hidrólise da acetilcolina. A inibição da acetilcolinesterase intensifica a transmissão do impulso em conseqüência do acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, aumentando assim o funcionamento do sistema nervoso (LARINI, 1987; AGUIAR et al., 2004). Diversos autores têm relatado efeitos subletais de peixes após a exposição ao inseticida trichlorfom, tais como alterações hematológicas em *Prochilodus scrofa*

(RANZANI-PAIVA et al., 1997), efeito agudo em baço de *Prochilodus scrofa* (RODRIGUES et al. 1997); histopatologia do fígado de *Brachydanio rerio* (RODRIGUES et al., 1998), lesões histopatológicas em fígado de *Prochilodus lineatus* (RODRIGUES et al., 2001) e parâmetros hematológicos e atividade da acetilcolinesterase em *Cyprinus carpio* (CHANDRASEKARA & PATHIRATNE, 2005).

FLORES-NAVA & VIZCARRA-QUIROZ (1988) relataram que, aplicando triclorfom na concentração de 60 e 80 mg/L em peixes jovens (*Cichlasoma urophthalmus* Günther), obtiveram 100% de mortalidade após 24 horas de exposição. A concentração intermediária (40 mg/L) resultou em 50% de mortalidade e na concentração de 10 mg/L não foi observada nenhuma morte. Entretanto, na concentração de 15 mg/L foram registrados três mortes após 72 horas de exposição. A concentração letal (CL₅₀) obtida em 24 horas foi 26,54 mg/L em 48 horas foi 23,71 mg/L e em 72 horas 17,19 mg/L. (Tabela1).

RODRIGUES et al. (1997) observaram *Prochilodus scrofa* após exposição ao Dipterec 500 (Triclorfom) e concluíram que o tecido esplênico apresentou-se atrofiado, observaram também decréscimos significativos na quantidade de eritrócitos, impossibilitando a visualização da polpa vermelha. Ocorrência de necrose focal (núcleos picnóticos) foi também constatada. RODRIGUES et al. (1998) observaram o fígado de *Brachydanio rerio* após 24 horas de exposição de Dimethoate 500 na concentração de 0,025 µL/L, e concluíram que houve aumento de células com necrose focal.

Em carpas, *Cyprinus carpio*, infestadas por *Argulus sp*, foi feito um acompanhamento do quadro hemático sete dias antes do tratamento, 13 e 33 dias após o tratamento com triclorfom (Neguvon) e notou-se que houve uma diminuição acentuada dos parasitas. Houve, ainda, um aumento do número de eritrócitos, dos leucócitos e da concentração de hemoglobina corpuscular média (RANZANI-PAIVA et al., 1987).

Tabela 1. Toxicidade aguda do triclorfom para organismos aquáticos - CL₅₀

| Espécie | Tempo de Exposição | mg/L | REFERÊNCIA |
|----------------------------------|--------------------|-------|---|
| Peixe | | | |
| <i>Salmo gairdneri</i> | 96 h | 4,85 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Salmo clarki</i> | 96 h | 1,68 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Onchorhynchus masou</i> | 96 h | 1,1 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Cyprinus carpio</i> | 24 h | 15,0 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Pimephales promelas</i> | 96 h | 51,0 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Anguilla rostrata</i> | 96 h | 8,57 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Roccus saxatilis</i> | 96 h | 9,2 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Cichlasoma urophthalmus</i> | 24 h | 26,54 | Flores-Nava & Vizcarra-Quiroz, 1988 |
| Artrópodes | | | |
| <i>Daphnia pulex</i> | 3 h | 0,18 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Daphia carinata</i> | 3 h | 0,014 | International Prog. on Chem. Safety, 1992 |
| <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | 96 h | 0,46 | Juarez & Rouse, 1983 |

Pelo fato do fígado ser um dos locais mais ativos na metabolização e tentativa de neutralização dos efeitos dos organofosforados em doses subletais, já nas primeiras horas após exposição ao agente tóxico, ocorre uma migração dos núcleos para a periferia, seguida de edema e necrose, podendo, entretanto, haver uma regeneração ao longo do tempo. Os organofosforados provocam, muitas vezes, modificações no epitélio renal e nas cápsulas de Bowman tais como separação das células dos túbulos renais e degeneração da cápsula (FANTA, 1991).

Além das alterações citadas, as brânquias também sofrem a ação dos organofosforados por ser um órgão com grande superfície de contato. São divididas em arcos branquiais e esses são formados por filamentos branquiais, que por sua vez contêm as lamelas branquiais. As lamelas secundárias são revestidas por células epiteliais, tendo em seu interior células pilares, células mucosas e, em peixes de ambiente marinho, as células de cloreto são responsáveis pela remoção de cloreto do sangue (HIBIYA, 1982).

GRASSO et al. (1998) analisaram quatro organofosforados (triclorfom, diclorvós, demeton-O-metil, e demeton-O) na água, por cromatografia gasosa. As amostras extraídas foram analisadas por um cromatografo HP 5890. O Triclorfom pode ser facilmente transformado em diclorvós em meio alcalino onde é considerado o primeiro produto de transformação em matrizes ambientais.

A resposta a um estressor depende muito da espécie de peixe e do monitoramento das condições ambientais. Para este estudo, foi escolhido o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) considerado de grande potencial para a piscicultura, representante do grupo Characiforme, subfamília Myleinae. É uma espécie altamente apreciada pela excelência da sua carne e de grande importância na pesca comercial (OLIVEIRA et al., 2004).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.H.; MORAES, G. A. I. M.; ALTRAN, A. E.; CORREA, C. F. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus* **Environmental Research**, California, v. 95, p. 224-230, 2004.

CARR, R. L.; CHAMBERS, J. E. Kinetic analysis of the *in vitro* inhibition, aging and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. **Toxicology and Applied Pharmacology**, California, v.139, p. 365-373, 1996.

CHANDRASEKARA, H. U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameter and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, Inglaterra, v. 36, p. 144-149, 2005.

CIOLA, R. **Introdução à cromatografia em fase gasosa**. São Paulo, Edgard Blucher, Ed. da Universidade de São Paulo, 1973, 231 p.

COLLINS, C.H., BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, Editora da UNICAMP, 1987, 298 p.

FANTA, E. Ação de poluentes sobre o tecido. In: HEID SUELI LEME DOS SANTOS. **Histologia de peixes**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 32-37.

FLORES-NAVA, A.; VIZCARRA-QUIROZ, J.J. Acute toxicity of trichlorfon (Dipterex) to fry of *Cichasoma urophthalmus* Gunther. **Aquaculture and Fisheries Management**. Inglaterra, v.19, p. 341-345, 1988.

GARÁDI, P.; DOMARCO, R. C.; ARAUJO, O. J.; PINHEIRO, C.W.L. Avaliação do uso de inseticida (orgânicos fosforados) no combate às Odonatas e na seleção

zooplanctônica em piscicultura de alevinagem. In: **CODEVASF**. Estudos de piscicultura. Brasília, 1988, p.71.

GRASSO, P.; BEFENATI, E.; TERRENI, M.; PREGNOLATO, M.; NATANGELO, M.; PAGANI, G. Deuterated internal standards for gas chromatographic mass spectrometric analysis of polar organophosphorus pesticides in water samples. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 822 p. 91-99, 1998.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology** . Normal and pathological features. New York: Kodansha Tokio, 1982. 147p.

INTERNACIONAL PROGRAME ON CHEMICAL SAFETY. **Trichlorfon (EHC 132, 1992)** 95p. Disponível em: < [www. Who. Int/das/ cat. 97/ zehc 2. htm.# n₀ 132: Trichlorfon](http://www.who.int/das/cat/97/zehc2.htm#n0132)>. Acesso em: 12 jan. 2003.

JUAREZ, L. M.; ROUSE, D. B. Acute toxicity of trichorfon to juvenile freshwater prawn. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda,M.D., v. 45, n. 4, p. 214-216, 1983.

LARINI, L. **Toxicologia**. Editora: Manole. São Paulo, 1987. 315p.

OLIVEIRA, A.M. B. M. S.; CONTE, L. CYRINO, J. E. Produção de Characiformes autóctones. In:CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Org.).Tópicos **Especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, São Paulo, 2004. 533p.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington: G.M. Rand &; S.R. Petrocelli eds. 1985. 665p.

RANZANI-PAIVA, M.T.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELLA, M. C.; CELIBERTO, R. J. Hematologia da carpa *Cyprinus carpio* infestada por *Argulus sp* e após um tratamento

com fosfonato de 0,0- dimetil – oxi – 2,2,2- tricloroetil (Neguvon). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 14, p.83-92, 1987.

RANZANI-PAIVA, M.T.; RODRIGUES, E.L.; EIRAS, A.C.; VEIGA, M. L.; PACHECO, F. J. Alterações Hematológicas em Curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.24, p.187-196, 1997.

RODRIGUES E. L.; RANZANI – PAIVA, M. J.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L.; EIRAS, A. C. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, p.197-203, 1997.

RODRIGUES E. L.; RANZANI – PAIVA, M. J.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L. Histopathologic lesions in the liver of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to a sublethal concentrations of the organophosphate insecticide Dipterex 500® (Trichlorfon). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n.2, p. 503-505, 2001.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E.; RODRIGUES, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia**. Curitiba, v.15, n.2, p.441-450,1998.

STRAUSS, D. L.; CHAMBERS, J. E. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterase of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 33 p.311-324, 1995.

ZAGATTO, P.A.; GOLDSTEIN, E.G. Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. **Ambiente**, São Paulo, v. 5, n.1, p.13-20, 1991.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE DA COLINESTERASE E DETERMINAÇÃO RESIDUAL DE TRICLORFOM EM PLASMA DE PACU (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do triclorfom em curto prazo no pacu (*Piaractus mesopotamicus*), determinando a atividade da colinesterase no plasma e cérebro dos peixes, além de determinar a quantidade residual de triclorfom no plasma e na água através de cromatografia gasosa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 concentrações (tratamentos) e 3 repetições (caixas) por tratamento, com 10 peixes por caixa. As concentrações de triclorfom usadas foram: 0,0; 0,025; 0,05 e 0,1 mg/L. Os efeitos subagudos do triclorfom nos peixes foram avaliados 1, 2, 7 e 15 dias após ter adicionado o triclorfom às caixas com o fluxo de água interrompido por 24 horas, mantendo a oxigenação. A atividade da colinesterase no plasma e no cérebro foi inibida pelo triclorfom, especialmente nas concentrações 0,05 e 0,1 mg/L, no 1º e 2º dias após exposição dos peixes ao praguicida, mas esse efeito desapareceu a partir do 7º dia. Para a análise cromatográfica, o éster correspondente da derivação do triclorfom apresentou limite de detecção de 3,0 µg/L. O lindane foi usado como padrão interno na concentração de 50 pg/µL. O tempo de retenção do triclorfom foi de 2,12 minutos e do padrão interno 5,56. Ótima linearidade foi obtida na faixa de 2 a 100 pg/µL. Não foi detectado resíduo de triclorfom nas amostras de plasma durante todo o período experimental, mas somente traços em algumas amostras da maior concentração (0,1mg/l), sendo o valor encontrado menor que o limite de detecção.

PALAVRAS-CHAVE: acetilcolinesterase, cérebro, peixe, cromatógrafo a gás, plasma, resíduos,

CHOLINESTERASE ACTIVITY AND RESIDUAL DETERMINATION OF TRICHLORFON IN PACU (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887) PLASMA.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the toxicity in a short time of the trichlorfon to pacu (*Piaractus mesopotamicus*) determining cholinesterase activity in plasma and in fish brain, and the residual amount of trichlorfon in fish plasma and water by gas chromatography. Experimental design was all fortuitous with 4 concentrations (treatment) and 3 repetitions (boxes) per treatment, with 10 fish each box. Used concentrations were 0.0; 0.025; 0.05 and 0.1 mg/L. Subacute effects of trichlorfon in fish were estimated 1, 2, 7 and 15 days after added trichlorfon to boxes with interrupted water flow by 24 hours after applications, keeping the aeration rate. Cholinesterase activity in plasma and brain was inhibited by trichlorfon, specially in concentrations 0.05 and 0.1 mg/L in the first and second days after exposition of fish to the pesticides, but this effect disappeared in the 7th day. To the chromatography analysis, ester corresponds from trichlorfon derivation, that showed detection limit of 3 µg/L. Lindane was used as intern standard in concentration of 50 pg/µL, Retention time of trichlorfon was 2.12 minutes and for the intern standard was 5.56. Great linearity was obtained between 2 to 100 pg/µL. It was not detected trichlorfon residues in plasma samples of higher concentration (0.1 mg/L) and the value obtained was lesser than detection limit.

Keywords: acetylcholinesterase, brain, fish, gás cromatographic, plasma, residues

1. INTRODUÇÃO

O uso de praguicidas na agropecuária tem estimulado pesquisas para avaliar o potencial de risco ambiental e os efeitos que provocam tanto a organismos alvo como nos organismos não alvo (EDWARDS, 1981; HEATH et al., 1993). Na piscicultura, os peixes estão sujeitos ao ataque de predadores ou parasitos que prejudicam o crescimento e provocam altas taxas de mortalidade. Geralmente, são aplicados os organofosforados como medida preventiva e/ou corretiva para a preservação e proteção da flora e da fauna aquáticas, medidas essas que nem sempre estão alicerçadas em estudos toxicológicos bem estabelecidos (STRAUSS & CHAMBERS, 1995; JUAREZ & ROUSE, 1983).

A utilização de testes ecotoxicológicos tem se consolidado como importante ferramenta para a compreensão dos impactos provocados por agentes químicos nas comunidades biológicas. Os ensaios de toxicidade expõem os indivíduos teste ao agente a ser testado com controle rigoroso das condições ambientais (temperatura e parâmetros físico-químicos da água), sendo seus efeitos (mortalidade e distúrbios fisiopatológicos) avaliados pela comparação com o indivíduo controle (RAND & PETROCELLI, 1985).

SANCHO et al. (2000) relataram que a presença de poluentes no ambiente em concentrações subletais pode ocasionar nos peixes alterações nos parâmetros bioquímicos com o objetivo de manter a homeostase ou atuar nas funções sensoriais e inibição da atividade enzimática, alterando o padrão de comportamento dos animais. Os organofosforados (OPs) provocam intoxicação nos peixes inibindo a acetilcolinesterase (AchE), o que aumenta a oferta de acetilcolina na fenda sináptica e exacerba a transmissão do impulso e, conseqüentemente, o funcionamento do sistema nervoso (STRAUSS & CHAMBERS, 1995).

RAO & RAO (1984), após a exposição de *Tilapia mossambica* ao organofosforado metil paratiom, verificaram bloqueio na condução do impulso nervoso e diminuição da atividade da acetilcolinesterase em tecidos como músculos, brânquias, fígado e cérebro. Do mesmo modo, STRAUS & CHAMBERS (1995) descreveram a

inibição da atividade da acetilcolinesterase no cérebro, brânquias, fígado e músculo de *Ictalurus punctatus* após exposição a organofosforados.

Além da constatação de alterações bioquímicas evidenciando a intoxicação, um bom trabalho de avaliação toxicológica ambiental não deve prescindir da análise quantitativa do agente tóxico, tanto no ambiente a ser estudado, como no sangue ou outros tecidos do organismo vivo em estudo.

Assim, ABBAS & HAYTON (1996) determinaram resíduos do paratiom e paraoxom em cérebro, coração, músculo branco, fígado, rim e plasma de peixe utilizando a cromatografia gasosa (CG). Esse método envolveu uma extração líquido-líquido de paratiom e paraoxom da água, plasma ou tecidos de truta arco-íris. O detector usado foi de captura de elétrons e o padrão interno usado foi o malatiom. O limite de detecção foi de 5 e 8 ng/mL para o paraoxom e paratiom respectivamente. Essas técnicas permitiram uma determinação quantitativa do paratiom e paraoxom em concentrações de 9 a 210 ng/mL; a recuperação variou de 79,4 a 110,3%, para tecidos, e de 91,9 a 100,0%, para plasma e água.

Com relação à degradação do triclorfom, o INTERNACIONAL PROGRAME ON CHEMICAL SAFETY (1992) relataram que o triclorfom se decompõe em um tempo curto para formar diclorvós na água em pH alcalino.

De fundamental importância em estudo de toxicologia ambiental é o conhecimento das condições físico-química do meio. Aqui em especial, a temperatura e o pH da água devem ser conhecidos e/ou controlados, afim de que se possam prever a degradação e/ou aparecimento de subprodutos que podem ainda apresentar alta toxicidade. Nesse contexto, SAMUELSEN (1987) estudou um método de cromatografia líquida (HPLC) para medir a degradação do triclorfom a diclorvós na água do mar em diferentes temperaturas (4,0; 8,5 e 13,5°C). Esse autor concluiu que a 13,5°C houve degradação acima de 90% do triclorfom em diclorvós, no intervalo de 1 a 4 horas. Conseqüentemente, conforme diminuiu a concentração do triclorfom, aumentou a concentração do diclorvós. Segundo HOFER (1981), a formação do diclorvós a partir do metrifonato (triclorfom) aumenta consideravelmente com o aumento do pH.

Para a realização do presente trabalho foi utilizado o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, espécie nativa da bacia do Prata, representante da ordem Characiformes, família Characidae, grupo dominante de peixes de água doce da América do Sul de grande valor econômico (OLIVEIRA et. al. 2004). A espécie vem sendo amplamente utilizada em piscicultura. Devido a sua natureza onívora, o pacu adapta-se a uma ampla variedade de alimentos e aceita muito bem rações balanceadas, o que tem possibilitado a obtenção de excelentes rendimentos da espécie em cultivos experimentais (CETESB, 1999).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade a curto prazo do triclorfom para o pacu, iniciando pela determinação da Cl_{50-96h} bem como determinar os efeitos de concentrações subagudas do organofosforado triclorfom, sobre a atividade da colinesterase no plasma e cérebro dos peixes e na quantidade residual de triclorfom no sangue (plasma) dos peixes e na água através de cromatografia gasosa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido com o monitoramento diário dos parâmetros físico-químicos que caracterizaram a qualidade da água. A temperatura foi de $26,9 \pm 0,4$ °C, pH $7,7 \pm 0,1$, oxigênio $8,8 \pm 0,5$ mg/L, alcalinidade 146 ± 11 mg/L, dureza 34 ± 5 mg/L e amônia $0,12 \pm 0,1$ mg/L, onde não foram observadas alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos (BOYD, 1982).

2.1. Substância Testada

O Padrão analítico do Triclorfom foi adquirido da Sigma (96%). Nome químico: Dimetil (2, 2, 2 - tricloro – 1– hidroxietil) fosfonato CAS [52-68-6]. Nome comercial: triclorfom, dipterex, tugon, neguvon e outros.

2.2. Determinação da toxicidade aguda (Cl_{50-96h}) do triclorfom

Os testes de avaliação da toxicidade aguda (Cl_{50-96h}) de triclorfom para pacu (peso médio de 50 g) foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Fitossanidade, da FCAV/Unesp – Câmpus de Jaboticabal e tiveram a

duração de 96 horas. Os experimentos foram conduzidos em sala climatizada com temperatura controlada entre $24 \pm 1^\circ\text{C}$ com auxílio de um condicionador de ar (Consul Airmaster, 10.000 BTU). Os peixes selecionados foram previamente aclimatados em caixa de amianto revestidas com tinta epóxi, com capacidade de 1000 L, por um período de sete dias, visando à detecção de parasitas, doenças e recuperação do estresse da captura e transporte. A alimentação durante este período consistiu de ração comercial e foi interrompida 24 horas antes do início dos testes.

Foram realizados testes preliminares para determinação das faixas de concentração letal do produto. Com base nos intervalos compreendidos entre a maior concentração não letal e a menor concentração letal dos testes preliminares, foram determinadas as seguintes concentrações de 0; 0,07; 0,12; 0,2; 0,34 mg/L do triclorfom utilizadas nos testes definitivos.

Nos testes definitivos, cada concentração foi avaliada com 4 repetições, contendo cinco animais cada, resultando em 20 animais por concentração, segundo as normas do IBAMA (1987) com algumas modificações. Os animais não receberam alimentação durante as 96 horas de exposição inicial e também não houve troca de água, caracterizando o sistema do teste como estático. As avaliações de mortalidade dos peixes foram feitas às 24h, 48h, 72h e 96h após o início dos testes, com retirada dos peixes mortos dos recipientes de vidro. Os valores de CL_{50-96h} foram calculados com o método estatístico “Trimmed Spearman Karber” (HAMILTON et al., 1977).

2.3. Determinação dos efeitos subletais do triclorfom

Utilizou-se exemplares de pacus jovens, sem distinção de sexo, com peso médio de 73 g, lotes homogêneos, isentos de contato prévio com agrotóxicos. O experimento foi conduzido no biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV, Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Jaboticabal.

2.3.1. Delineamento Experimental

No experimento foram utilizados 120 espécimes de pacu. Antes de serem utilizados nos testes, os peixes foram pesados e aclimatados em caixas de amianto

revestidas com tinta epóxi, com capacidade de 100 L, por um período de duas semanas visando à detecção de parasitas, doenças e recuperação do estresse da captura e transporte. Durante esse período a alimentação oferecida foi à ração comercial. As concentrações usadas no experimento: 0,0 – 0,025 – 0,05 – 0,1 mg/L. Cada concentração foi avaliada com três repetições (caixas), contendo 10 peixes/caixa.

Os efeitos subletais do triclorfom nos peixes foram avaliados aos 1, 2, 7 e 15 dias após ter-se adicionado o triclorfom às caixas com o fluxo de água interrompido por 24 horas mantendo-se a oxigenação. Após as 24 horas de exposição, foi realizada a primeira coleta (1 dia) e o fluxo de água foi restabelecido em todas as caixas, na vazão de 400 mL/ min até o final do experimento. Nos dias de coleta, os peixes estavam em jejum por 24 horas. Nas coletas dos dias 1 e 2, três peixes por repetição foram sacrificados para a retirada do material biológico (n=9). Entretanto, nas coletas dos dias 7 e 15 foram amostrados 2 exemplares/repetição (n=6). Os peixes foram capturados e imediatamente anestesiados com benzocaína adicionada na água na concentração de 1g/15L (CARNEIRO & URBINATI, 2001). O sangue foi retirado por punção caudal, com auxílio de seringas descartáveis previamente heparinizadas para imediata separação do plasma (colinesterase e cromatografia). De cada indivíduo foi retirado o cérebro para dosagem da colinesterase, sendo imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a 70° C negativos para posterior análise no Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp – Campus de Araraquara.

2.3.2. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa computacional SAS (statistical analysis system). Os dados foram submetidos a análise de variância Anova. As médias dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

2.4. Dosagem da atividade da colinesterase

O método utilizado na determinação da atividade da colinesterase tanto no homogeneizado de cérebro como no plasma foi o de ELLMAN et al., (1961). Esse método é cinético e produz coloração amarela cuja intensidade é proporcional a quantidade de acetilcolina degradada pela ação da enzima em ácido acético e tiocolina, que reage com íon ditiobisnitrobenzólico produzindo o complexo colorido. Amostras de cérebro foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0, em volume 10 vezes maior que o peso do tecido em gramas, por sonicação (temperatura: 20^oC, amplitude 60%, tempo 8 s, pulso 3s e pausa de 0,5 s) posteriormente, 1 mL deste sonicado foi diluído em 19 mL do tampão fosfato, pH 8,0, fornecendo concentração de 5 mg/mL, segundo a técnica citada.

TECIDO

2,6 mL tampão fosfato pH 8,0
400 µL homogeneizado 5mg/mL

100 µL solução DTNB

↓ agitar

Leitura 412 nm tempo zero

↓

50 µL solução Ach

↓

Leitura 412 nm

Tempo 1, 2, 3, 4 e 5 minutos

PLASMA

2,9 mL tampão fosfato pH 8,0

100 µL plasma

100 µL solução DTNB

↓ agitar

Leitura 412 nm tempo zero

↓

50 µL solução Ach

↓

Leitura 412 nm

Tempo 1, 2, 3, 4 e 5 minutos

2.5. Determinação Cromatográfica

2.5.1. Soluções-padrão e reagentes

As soluções de triclorfom (Sigma) foram preparadas em acetona. A solução-padrão estoque foi preparada na concentração de 1mg/mL, diluída para solução de trabalho para 3; 10; 25; 50 e 100 ng/mL utilizadas na padronização do método. A solução-padrão estoque de Lindane (Ihara 99,9% - padrão interno) foi preparada na concentração de 1 mg.mL⁻¹ e diluída para concentração de 50 ng/mL. Todos os solventes usados na preparação da amostra foram de grau p.a.

Apesar de ser um organofosforado, o triclorfom apresenta uma polaridade razoável, fato este que se obriga a uma derivação para melhor e mais rápida análise, que foi feita conforme o esquema a seguir:

Solução de triclorfom + padrão interno

↓ evaporar sob fluxo de N₂
em banho seco 48 ±1°C

Resíduo

↓ +1 mL Sol. benzeno-piperidina 5%
+5µL anidrido acético
banho seco a 70 °C por 90 min

Éster derivado

↓ lavar com 2mL sol sat NaHCO₃

Éster derivado lavado

↓ secar com Na₂SO₄ anidro e ajustar vol. a 1
mL com benzeno

Injetar 1µL

2.5.2 Análise Cromatográfica

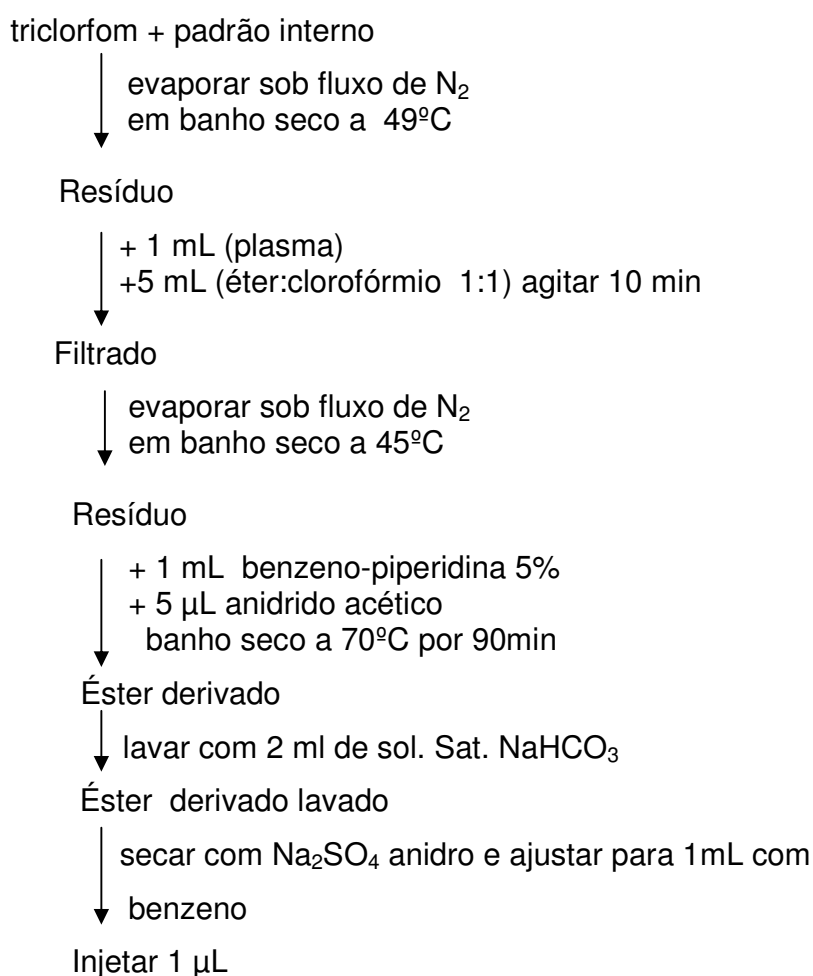
Foi utilizado o cromatógrafo a gás CG modelo 370 equipado com detector de captura e elétrons (⁶³Ni). Condições cromatográficas: detector 230°C; vaporizador 190°C; coluna (1,5%OV-17 + 1,95% QF-1 sobre Chromosórbio WHP 80-100mesh vidro Φ 1/8" x 1,8 m), 176°C; fluxo de N₂ :49,0 mL/min. Os cromatogramas foram obtidos

através do acoplamento de um integrador HP(Hewlett Packard) 3396 série H, o que permite tanto a identificação pela comparação dos tempos de retenção, bem como a quantificação pela integração dos picos.

2.5.3. Preparação da amostra (Plasma)

Um mL de plasma foi utilizado para fazer a extração líquido-líquido conforme esquema abaixo:

Recuperação do triclorfom



2.5.4. Validação da metodologia analítica

Os parâmetros analíticos determinados foram a curva de calibração (linearidade do detetor para o triclorfom), recuperação, limite de detecção e limite de quantificação.

2.5.5. Curva de calibração

A curva de calibração foi feita com 5 repetições através da derivação de diferentes concentrações do triclorfom. Em seguida, foram calculadas as equações de regressão linear ($y = ax + b$) e os coeficientes de determinação (r^2) para visualizar a faixa de linearidade do detector.

2.5.6. Recuperação relativa

A recuperação relativa do triclorfom em plasma foi realizada utilizando o lindane como padrão interno. O cálculo de recuperação relativa foi realizado através da relação dos quocientes obtidos entre a área do triclorfom dividida pela área do padrão interno obtida nas amostras fortificadas, em relação aos quocientes obtidos entre a área do triclorfom dividida pela área do padrão interno obtida nas diferentes concentrações da curva de calibração.

$$RR = \text{área (T/PI) obtida após extração} / \text{área (T/PI) obtida na calibração}$$

2.5.7. Recuperação absoluta

A recuperação absoluta do plasma foi calculada pela divisão das áreas obtidas do triclorfom nas amostras fortificadas pela áreas obtidas do triclorfom nas diferentes concentrações da curva de calibração.

$$RA = \text{área (T) obtida após extração} / \text{área (T) obtida na calibração}$$

2.5.8. Limite de detecção

Segundo orientação de TEIR & ZEUMER (1987), o limite de detecção foi considerado a menor concentração de triclorfom adicionado à matriz (plasma ou tecido) que pode ser identificado como um sinal estatisticamente ($p < 0,05$) diferente do ruído.

2.5.9. Limite de quantificação

Também seguindo orientação de TEIR e ZEUMER (1987), o limite de quantificação foi considerado como a menor concentração de triclorfom adicionado à

matriz (plasma) que apresentou sinal maior que o limite de detecção, associado a uma recuperação maior que 80% e coeficiente de variação inferior a 10%.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação da toxicidade aguda (CI_{50-96h}) do triclorfom

No grupo controle não ocorreu morte durante as 96 horas. Na concentração de 0,07; 0,12; 0,20 e 0,34 ocorreram 20%, 40%, 60% e 100% de mortalidade respectivamente. A equação linear que representa a relação concentração-resposta do triclorfom estimada para exemplares juvenis de *P. mesopotamicus* foi $y = 289,14x + 2,2316$, ($r^2=0,9955$). A CI(I)_{50-96h} foi de 0,1906 mg/L de triclorfom.

3.2. Dosagem da atividade da colinesterase

A atividade da colinesterase nas diferentes concentrações de triclorfom em cérebro e plasma de pacu estão representadas nas Figuras 1 e 2. Na Tabela 1 e 2 estão representados as médias e o erro padrão.

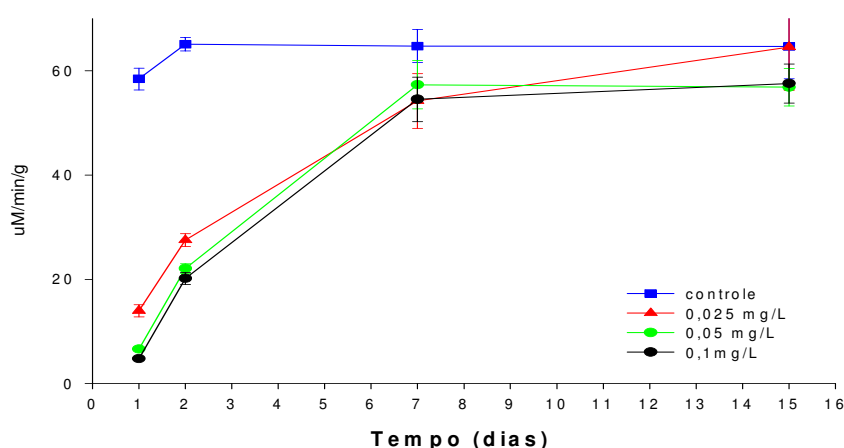


Figura 1. Atividade da colinesterase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$) no cérebro de *Piaractus mesopotamicus* exposto a triclorfom adicionado na água.

Tabela 1. Valores médios e erro padrão da atividade da colinesterase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$) no cérebro nos dias de exposição x concentrações.

| Tratamento mg/L | DIAS DE COLETA | | | |
|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | 1 (n = 9) | 2 (n = 9) | 7 (n = 6) | 15 (n = 6) |
| 0 | 58,42 \pm 5,91 Aa | 65,08 \pm 3,91 Aa | 64,74 \pm 7,75 Aa | 64,63 \pm 13,85 Aa |
| 0,025 | 13,97 \pm 3,52 Ab | 27,52 \pm 3,63 Ab | 54,21 \pm 12,81Ba | 64,54 \pm 20,25 Ba |
| 0,05 | 6,61 \pm 0,82 Ac | 22,06 \pm 2,59 Bc | 57,31 \pm 11,35 Ca | 56,83 \pm 8,86 Ca |
| 0,1 | 4,78 \pm 0,36 Ac | 20,16 \pm 3,51 Bc | 54,51 \pm 10,41Ca | 57,55 \pm 8,36 Ca |

Médias \pm erro padrão da média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de coleta. Média \pm erro padrão da média seguido de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações.

Conforme pode ser observado na Figura e Tabela 1, não houve diferença significativa nas médias na avaliação da atividade da colinesterase do cérebro nos peixes controles (grupo 0 mg/L) nos diferentes dias de coleta. Por outro lado, ao observar as médias da atividade enzimática dos animais expostos às concentrações 0,025; 0,05 e 0,1 mg/L em relação ao grupo controle, observa-se uma significativa inibição da colinesterase do cérebro nas 2 primeiras coletas, nos peixes expostos ao triclorfom, essa diferença desapareceu ao 7º dia após exposição. Pode-se observar também que a inibição foi mais acentuada nos peixes do tratamento com triclorfom nas concentrações 0,05 e 0,1 mg/L no primeiro e segundo dias após exposição ao agente tóxico.

O efeito inibitório do triclorfom sobre a enzima colinesterase no plasma de peixes expostos as concentrações 0,025; 0,05 e 0,1 mg/L pode ser observado na Figura e Tabela 2. Houve diferença significativa entre a atividade da enzima dos peixes do grupo controle e dos grupos tratados já no primeiro dia de exposição, voltando ao normal no 7º e 15º dias de exposição ao triclorfom.

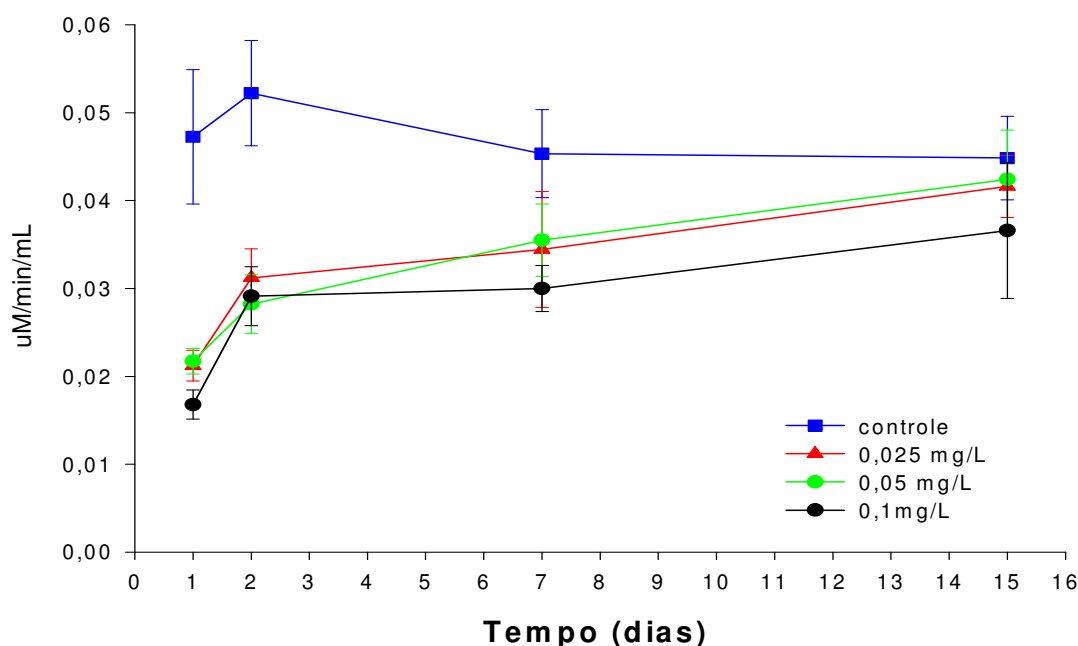


Figura 2. Atividade da colinesterase plasmática de *P. mesopotamicus* ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$) exposto ao triclorfom adicionado na água.

Tabela 2. Valores médios e erro padrão da atividade da colinesterase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$) do plasma nos dias de exposição x concentrações.

| mg/L | DIAS DE COLETA | | | |
|-------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| | 1 (n = 9) | 2 (n = 9) | 7 (n = 6) | 15 (n = 6) |
| 0 | 0,047 ± 0,02 Aa | 0,052 ± 0,01 Aa | 0,045 ± 0,01 Aa | 0,044 ± 0,01 Aa |
| 0,025 | 0,021 ± 0,00 Ab | 0,031 ± 0,01 ABb | 0,033 ± 0,02 ABa | 0,042 ± 0,01 Ba |
| 0,05 | 0,022 ± 0,00 Ab | 0,028 ± 0,01 ABC | 0,035 ± 0,01 ABa | 0,042 ± 0,01 Ba |
| 0,1 | 0,016 ± 0,00 Ab | 0,029 ± 0,01 ABC | 0,030 ± 0,01 ABa | 0,036 ± 0,02 Ba |

Médias \pm erro padrão da média, seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de exposição. Média \pm erro padrão da média seguido de letras minúsculas na mesma coluna indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre concentrações.

A análise cromatográfica do triclorfom foi realizada utilizando a metodologia de padronização interna. Essa metodologia é sem dúvida a mais apropriada para se fazer

análise quantitativa, principalmente quando envolve derivação do analito que geralmente apresenta pontos críticos passíveis de erros que foram automaticamente compensados pelo padrão interno. O éster correspondente da derivação do triclorfom utilizando anidrido acético, reação esta catalizada pela piperidina em meio benzênico, apresentou sensibilidade com nível de baixo ppb com limite de detecção de 3 ng/mL. Os cromatogramas da curva de calibração indicaram tempo de retenção do triclorfom de 2,12 minutos e o do padrão interno de 5,56 minutos, ou seja, retenção relativa de 0,38 minutos como mostra a Figura 3.

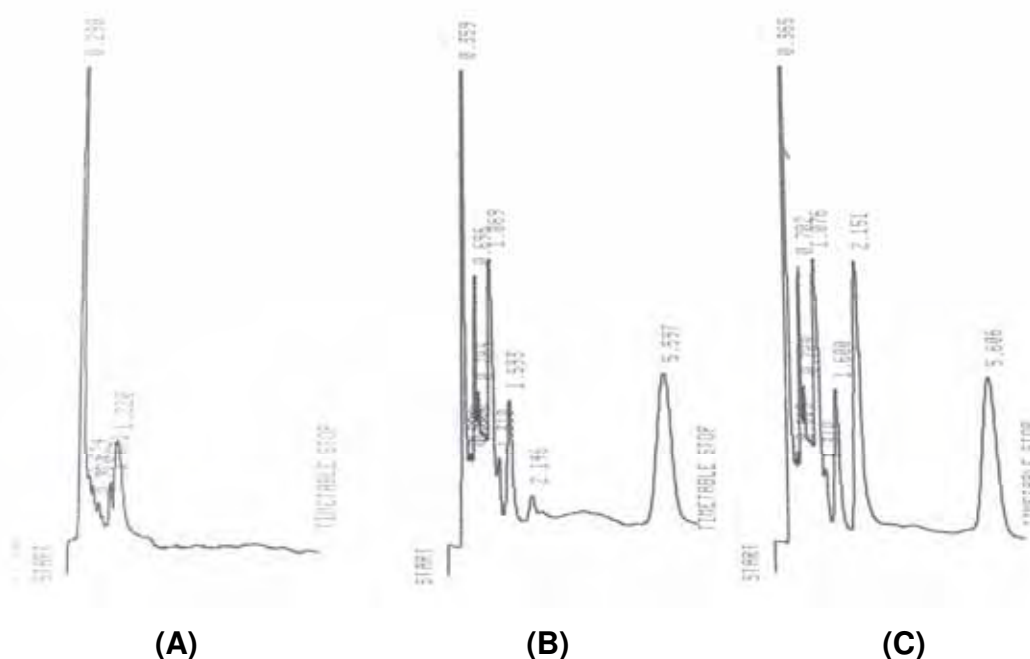


Figura 3. Cromatograma típico da curva de calibração do triclorfom e lindane como padrão interno, (A) branco, (B) triclorfom 2 pg/μL e padrão interno 50 pg/μL, (C) triclorfom 100 pg/μL e padrão interno 50 pg/μL.

A Figura 4 mostra a curva de calibração (linearidade do detetor) do triclorfom usando 50 pg/μL de lindane como padrão interno (média de 5 injeções). A faixa de concentração de 2 a 100 pg/μL apresentou ótima linearidade para o derivado éster do triclorfom; cujo ajuste através de regressão forneceu a equação: $y = 0,0137x + 0,0166$. O Coeficiente de Correlação (r^2) de 0,9987 indicou que a linearidade entre as

concentrações (x) e as áreas (y) dos picos, no intervalo utilizado é altamente satisfatória.

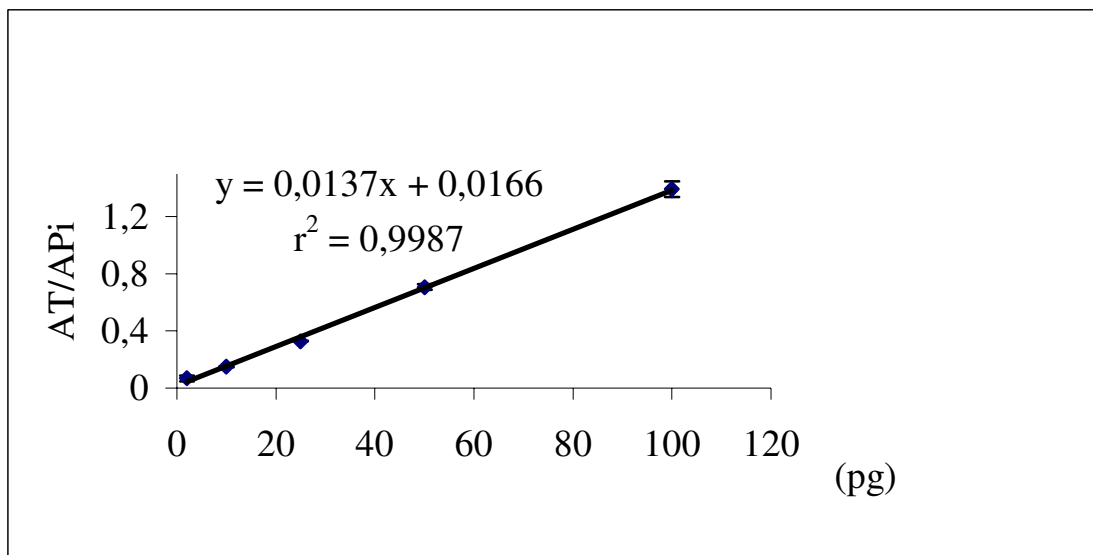
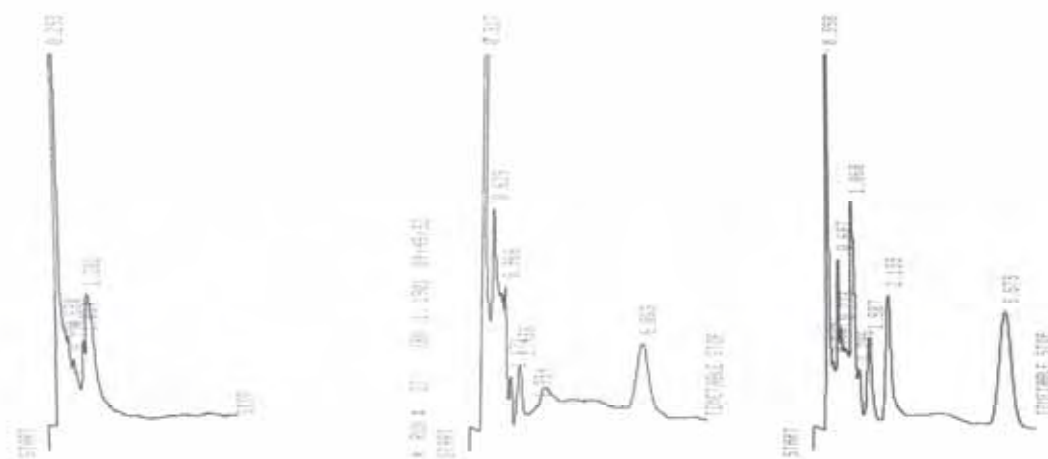


Figura 4 - Curva de calibração do detector para linearidade de resposta à diferentes concentrações do triclorfom. AT = área do triclorfom API = área do padrão interno

Os cromatogramas obtidos com o detector de captura de elétrons (ECD) para o controle e recuperação de triclorfom em plasma estão apresentados nas Figuras 5. Após a calibração, foi feita uma curva de recuperação do triclorfom do plasma de peixe ($n=5$), cuja equação calculada foi $y = 0,0125x + 0,0364$, conforme mostra a Figura 6. A concentração do lindane usada na recuperação do triclorfom no plasma foi de 50 ng/mL.



(A)

(B)

(C)

Figura 5. Cromatograma típico da recuperação do triclorofom e do lindane do plasma. (A) controle, (B) Limite de detecção: triclorofom 3 ng/mL e padrão interno 50 ng/mL, (C) triclorofom 50 ng/mL e padrão interno 50 ng/mL.

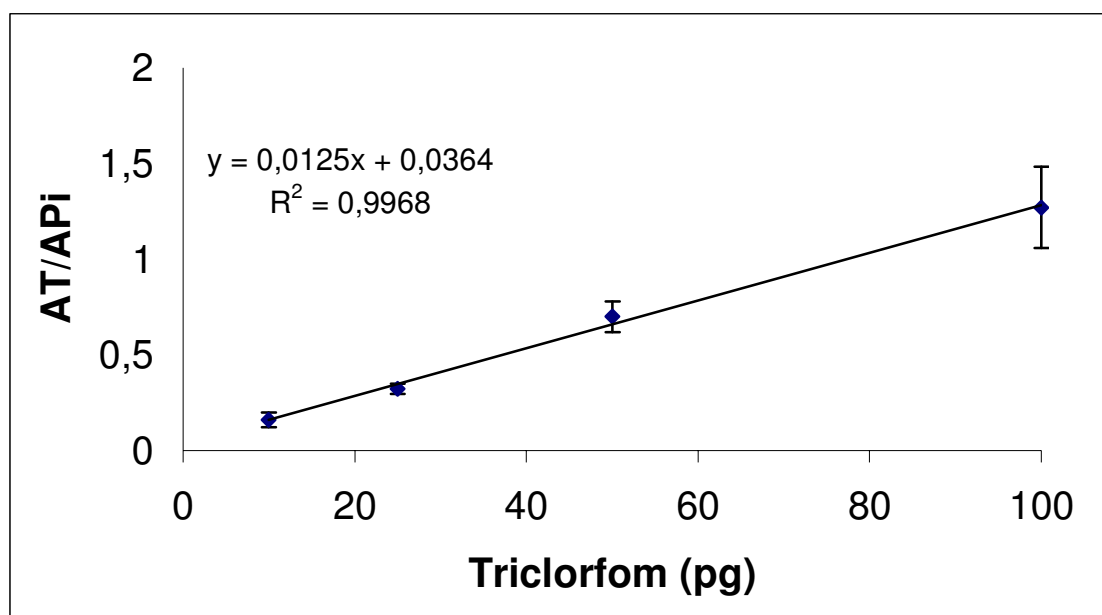


Figura 6. Curva de recuperação do triclorofom no plasma usando como padrão interno o lindane. AT = área do triclorofom API = área do padrão interno

Na metodologia do padrão interno, as perdas de analito em quaisquer fases são compensadas pelas perdas do padrão interno, portanto automaticamente a relação é corrigida. Valores absolutos da recuperação do triclorfom são apresentados na Tabela 3. A média absoluta de recuperação dos valores das amostras de plasma enriquecidos com triclorfom foi $92,39 \pm 6,9$. O coeficiente de variação absoluto (CV) observado foi de 7,5% para o plasma. Os resultados da recuperação relativa estão descritos na Tabela 4.

Tabela 3. Valores da recuperação absoluta (RA) do triclorfom em plasma de *Piaractus mesopotamicus*.

| Adicionado | | área - μ v | | % recuperação plasma |
|----------------|---------------|----------------|------------------|----------------------|
| μ g plasma | injetado (pg) | esperado | observado plasma | |
| 0,100 | 100 | 83632 | 81035 | 96,89% |
| 0,05 | 50 | 53347 | 52529 | 98,47% |
| 0,025 | 25 | 21930 | 19955 | 90,99% |
| 0,010 | 10 | 19858 | 18102 | 91,16% |
| 0,003 | 3 | 9520 | 8244 | 86,60% |

$$RA = \text{área triclorfom obtido extração} / \text{área triclorfom obtido simplesmente após derivação} \times 100$$

Tabela 4. Valores da Recuperação Relativa do triclorfom em plasma de *Piaractus mesopotamicus*.

| concentração μ g/mL plasma | Plasma RR | CV |
|--------------------------------|-------------------|-----|
| 0,1 | 91,19 | |
| 0,05 | 98,84 | |
| 0,025 | 98,06 | |
| 0,01 | 106,51 | |
| 0,003 | 110,60 | |
| Média \pm DP | 101,04 \pm 7,62 | 7,5 |

$$RR = \text{área (T/ Pi) obtido extração} / \text{área (T/Pi) obtido simplesmente após derivação} \times 100.$$

Após a otimização do método analítico foi efetuada a análise quantitativa das amostras de plasma de peixes. O padrão interno foi mensurável, porém os níveis de resíduos das amostras não foram maiores que o limite de quantificação, portanto os resultados analíticos não podem ser expressos como um valor numérico.

Na curva de dissipação, (Figura 7), estão apresentados os valores médios dos resíduos do triclorfom (AT/Pi), na água das caixas de tratamento dos peixes coletadas durante o experimento (n = 5).

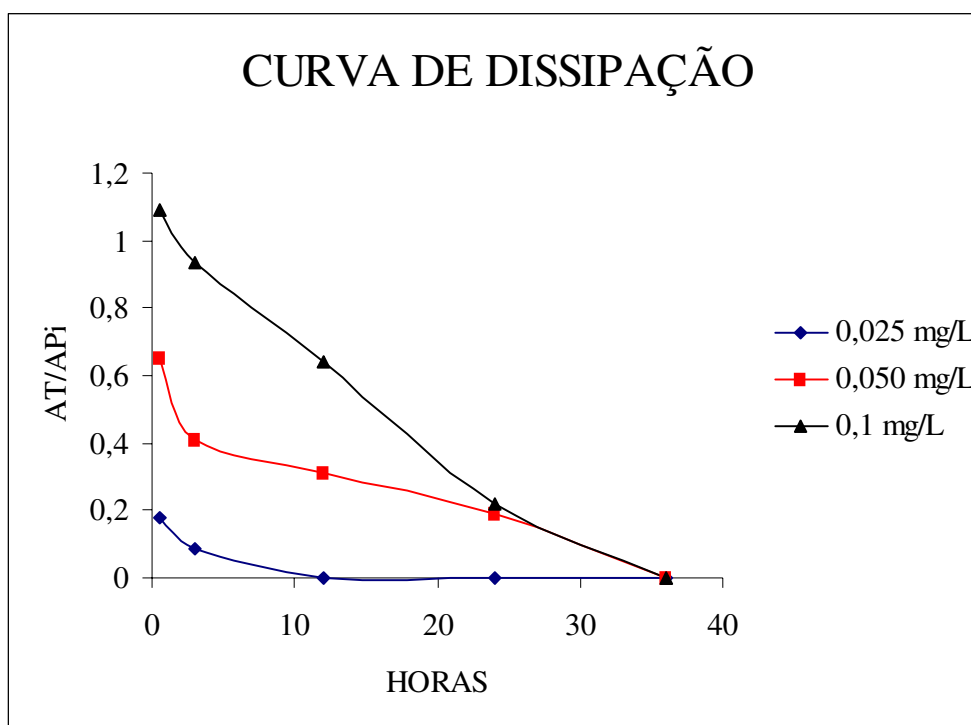


Figura 7. Curva de dissipação do triclorfom na água coletada das caixas dos tratamentos 0,025; 0,050 e 0,1 mg/L durante as coletas. A água do tratamento 0 mg/L não deu nenhum resíduo.

4. DISCUSSÃO

O principal efeito do organofosforado é a inibição da enzima colinesterase no cérebro de peixes, segundo RAO & RAO (1984) e HEATH et al. (1993). A análise dos resultados obtidos neste experimento demonstra que o triclorfom é um praguicida inibidor da colinesterase tanto para cérebro como para plasma para a espécie pacu.

Para a dosagem da colinesterase, SILVA FILHO et al. (2000) relataram a importância da escolha de uma espécie a ser usada como bioindicadora de exposição a

praguicidas, usando a metodologia proposta por Elman et. al. (1961), pH 7,5 e temperatura de 25 ± 2 °C. Para peixes dulcícolas, estes mesmos autores, encontraram grandes variações nos níveis teciduais de atividade da colinesterase. No cérebro destacam-se os níveis elevados de atividade da acetilcolinesterase para o cascudo, ficando o pacu numa faixa mais baixa. Pode-se observar esse efeito no presente trabalho onde o pacu também mostram inibição da atividade da colinesterase quando exposto ao triclorfom.

Para comprovar a alta toxicidade do paratiom (2 mg/L) no *Brycon cephalus*, AGUIAR et al. (2004), após 96 h de exposição, observaram que a atividade da acetilcolinesterase do cérebro foi inibida em 87% ($164 \pm 4,95$ para $21,7 \pm 0,96$ mU/mg de proteína a 25°C). Para a acetilcolinesterase do plasma a inibição observada foi menor que a do cérebro, ficando em 64% de inibição ($1,7 \pm 0,11$ para $0,60 \pm 0,046$ mU/mg de proteína). Esses resultados foram similares ao encontrados neste trabalho.

CHANDRASEKARA & PATHIRATNE (2005) expuseram exemplares de *Cyprinus carpio* a concentrações 0,25 e 0,5 mg/L de triclorfom por 1 e 24 h e concluíram que a atividade da acetilcolinesterase no cérebro foi significativamente menor quando comparada ao grupo controle (52% de inibição na concentração 0,25 mg/L e 57% de inibição na concentração 0,50 mg/L).

Os métodos analíticos têm conduzido a maioria dos monitoramentos dos resíduos agrícolas, produtos alimentícios e em matrizes ambientais. ABBAS & HAYTON (1996) desenvolveram um sensível método de cromatografia gasosa para determinação simultânea do paratiom e seu metabólito paraoxom da água, plasma ou tecidos de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris). O limite de detecção foi de 5 e 8 ng/mL para o paraoxom e paratiom, respectivamente. JUAREZ & ROUSE (1983) observaram a toxicidade aguda do triclorfom em *Macrobrachium rosenbergii* e os resíduos foram analisados por cromatografia gasosa. O limite de detecção foi de 0,08 mg/L e o tempo de retenção do triclorfom foi de 2,5 min onde não foi detectável nenhum resíduo dentro de 30 dias.

GRASSO et al. (1998) relataram que a disponibilidade dos padrões internos apropriados melhora a qualidade da análise quantitativa dos praguicidas aumentando

sua exatidão e precisão. Esses autores adicionaram o triclorfom na água e analisaram no cromatógrafo CG – MS. O limite de tolerância foi de 25 pg para o triclorfom derivado. Também relataram que o limite de detecção dos praguicidas na água é 0,1 µg/L segundo a União Européia, neste trabalho o éster correspondente da derivação do triclorfom apresentou sensibilidade com limite de detecção de 3 ng/mL.

SAMUELSEN (1987) verificou que a degradação do triclorfom em diclorvós em água salgada está relacionada com a temperatura, pH e principalmente taxa de aeração. Foi mensurado a meia-vida do triclorfom em horas com temperatura de 4,5 e 13,5°C com valores de pH variando entre 7,7; 8,0 (alta taxa de aeração); 8,0 (baixa taxa de aeração). Concluiu-se que o aumento do pH se deve ao consumo de oxigênio provocado pela respiração e a degradação do triclorfom na água salgada em 13,5°C foi mais rápido no pH 8,0 com maior taxa de aeração. HOFER (1981) relata que a taxa de formação de diclorvós a partir do triclorfom aumenta consideravelmente com o aumento do pH.

De acordo com os resultados apresentados na curva de dissipação dos resíduos do triclorfom na água (pH 7,7 ±1) da Figura 7, em 3 horas após administração do triclorfom nas caixas, as concentrações 0,025, 0,05 e 0,1 mg/L apresentaram resíduos, em 12 horas, as concentrações 0,05 e 0,1 mg/L de triclorfom também apresentaram resíduos. Destaca-se que até 24 horas o fluxo foi interrompido, mantendo-se somente a oxigenação. Após 30 horas da administração do triclorfom nas caixas, com o fluxo de água contínuo, somente a concentração 0,1 mg/L de triclorfom ainda não tinha se dissipado totalmente. O termo dissipação pode ser utilizado para caracterizar o declínio dos resíduos do triclorfom por qualquer processo físico, químico ou biológico.

GARCIA-REPETTO et al. (1994) estudaram a influência do pH, temperatura e luz solar na degradação do triclorfom em solução aquosa e concluíram que, em pH ácido, o organofosforado foi mais estável, variando com o aumento do pH.

O método analítico para resíduos do triclorfom no plasma de peixe foi considerado adequado. Não foi detectado resíduo nos cromatogramas obtidos das análises das amostras de plasma durante todo o experimento, porém foram

determinados traços de resíduos de triclorfom em algumas amostras da maior concentração (0,1 mg/L), sendo o valor encontrado menor que o limite de detecção.

O triclorfom provocou altas taxas de inibição na atividade da colinesterase em *P. mesopotamicus*. Os resultados levam a conclusão de que é importante determinar o equilíbrio da bioconcentração do triclorfom analisando suas propriedades em relação a temperatura e pH a fim de controlar eventuais problemas de intoxicações pelo aumento da toxicidade e contribuir no estudo da avaliação do risco ambiental.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS , R.; HAYTON, W.L. Gás chromatographic determination of parathion and paraoxon in fish plasma and tissues. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles, v.20, p. 151-154, 1996.

AGUIAR, L.H.; MORAES, G. A. I. M.; ALTRAN, A. E.; CORREA, C. F. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus* **Environmental Research**, California, v. 95, p. 224-230, 2004.

CARNEIRO, P. C.; URBINATI, E. C. Plasma eletrolyte distunbance in matrinxã *Brycon cephalus*, (Teleos: Characidae) transported under influence of benzocaine, **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 11, n. 4, p. 321- 326, 2001.

CETESB. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Água – teste de toxicidade aguda com peixes – parte 1 – sistema estático**. São Paulo, v.II, 1999, p.1-29.

CHANDRASEKARA, H. U.; PATHIRATNE, A.. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameter and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L.. **Aquaculture Research**, Inglaterra, v. 36, p. 144-149, 2005.

EDWARDS, C.A. **Persistent Pesticides in the Environment**. 4.ed. Florida: CRC Press. 1981, 170 p.

ELMANN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.J. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. New York, US, v.7, 1961, p. 88-95.

GARCIA-REPETTO, R.; MARTINEZ, D.; REPETTO, M. The influence of pH on the degradation kinetics of some organophosphorus pesticides in aqueous solutions. **Vet Human Toxicology**, Hampshire, Inglaterra, v.36, n.3, p. 202-204, 1994.

GRASSO, P.; BEFENATI, E.; TERRENI, M.; PREGNOLATO, M.; NATANGELO, M.; PAGANI, G. Deuterated internal standards for gas chromatographic mass spectrometric analysis of polar organophosphorus pesticides in water samples. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v. 822 p. 91-99, 1998.

HEATH, A.; CECH, J. J.; ZINKL, J. G.; STEELE, M. D. Sublethal effects of three pesticides on Japanese medaka. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v.25, p.485-491, 1993.

HAMILTON, M.A. RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, Washington, v.11, n. 7, p. 714 – 719, 1977.

HOFER, W. Chemistry of metrifonate and diclorvós. **Acta Pharmacologica Et Toxicologica**. Kobenhavn, DK v.49 suppl. P.7-14, 1981.

INTERNACIONAL PROGRAME ON CHEMICAL SAFETY. **Trichlorfon (EHC 132, 1992)** 95p. Disponível em: < www. Who. Int/das/ cat. 97/ zehc 2. htm.# n_o 132: Trichlorfon>. Acesso em: 12 jan. 2003.

JUAREZ, L. M.; ROUSE, D. B. Acute toxicity of trichlorfon to juvenile freshwater prawn. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda, M.D., v. 45, n. 4, p. 214-216, 1983.

OLIVEIRA, A.M. B. M. S.; CONTE, L. CYRINO, J. E. Produção de Characiformes autóctones. **Tópicos Especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, São Paulo, 533p. 2004.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington: G.M. Rand &; S.R. Petrocelli eds. 1985. 665p.

RAO, K.S.P.; RAO, K.V.R. Impact of methyl parathion and parathion toxicity and eserine inhibition on acetylcholinesterase activity in tissue of teleost *Tilapia mossambica* – a correlative study. **Toxicology Letters**. Amsterdam, 22:351-6, 1984.

SAMUELSEN, O. B. Degradation of trichlorfon to DICLORVÓS in seawater: A preliminary report. **Aquaculture**. v. 60, p. 161-164, 1987.

SANCHO, E.; FERNANDEZ-VEGA, C.; SANCHEZ, M.; FERRANDO, M. D.; ANDREU-MOLINER, E. Alterations on AchE activity of the fish *Anguilla anguilla* as response to herbicide-contaminated water. **Ecotoxicology and Environmental safety**. Espanha. v. 46, p. 57-63, 2000.

SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. M.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; ALVES, M. V. E CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas para biomarcação com colinesterase de peixes. In: ESPINDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. B.; ROCHA, O; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. **Ecotoxicologia. Perspectivas para o século XXI**. São Carlos, 2000, p. 147 – 164.

STRAUSS, D. L.; CHAMBERS, J. E. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterase of fingerling channel catfish by chorpyrifos, parathion and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 33 p.311-324, 1995.

THEIR, H.P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: VCH. Publishers, 1987. v.1, p. 24-32, 100-120

CAPÍTULO 3

HISTOPATOLOGIA DE FÍGADO, RIM E BRÂNQUIAS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) EXPOSTO ÀS CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE TRICLORFOM

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de concentrações subletais de triclorfom sobre a estrutura de fígado, rim e brânquias de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Os peixes foram expostos às concentrações de 0,0 – 0,025 – 0,05 – 0,1 mg/L de triclorfom e amostrados 1, 2, 7 e 15 dias depois da exposição. Os órgãos foram coletados, fixados em solução Bouin, incluídos em parafina, seccionados a uma espessura de 5,0 µm e corados com hematoxilina e eosina (HE). No fígado dos peixes expostos ao triclorfom foi observado que as células hepáticas apresentaram perda do formato regular e do arranjo cordonal, deslocamento do núcleo para periferia e fusão celular. Em alguns locais, observaram-se áreas focais de necrose, caracterizadas pela presença de células com núcleo picnótico, ausência de coloração no citoplasma e a presença de células hipertrofiadas. Um e 2 dias após a exposição, o fígado apresentou áreas focais de necrose, porém, aos 7 e 15 dias ao tratamento, esses locais necrosados ocuparam dimensões maiores ao longo do tecido, principalmente nas proximidades do pâncreas exócrino intra-hepático. No rim dos peixes expostos ao triclorfom, observou-se redução da coloração citoplasmática das células dos túbulos contorcidos, espessamento da cápsula glomerular e colapso do glomérulo provocando um aumento do espaço pericapsular de Bowman. Os peixes expostos à concentração de 0,025 mg/L não apresentaram alterações na estrutura branquial em relação ao grupo controle. Porém, os peixes expostos aos tratamentos com 0,05 e 0,1 mg/L de triclorfom apresentaram alterações histológicas nas brânquias em relação aos grupos controle e 0,025 mg/L de triclorfom, tais como hiperplasia das células das lamelas, edema subepitelial, fusão lamelar; telangiectasia e congestão em algumas regiões.

PALAVRAS – CHAVE: organofosforado, triclorfom, peixe, praguicida, histopatologia

HISTOPATHOLOGY OF LIVER, KIDNEY AND GILLS OF PACU (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) EXPOSED TO SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF TRICHLORFON

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of sublethal concentrations of trichlorfon in the structure of liver, kidney and gills of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fish were exposed to concentrations of 0.0 – 0.025 – 0.05 – 0.1 mg/L of trichlorfon and sampled 1,2,7 and 15 days after. Organs were collected, fixed in Bouin's fluid, included in paraffin, and 5 µm sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). In the liver of fish exposed to trichlorfon was observed the loss of regular form and cordonal arrangement of cells, displacement of nucleus for the periphery and cellular fusion. In some regions there were focal areas of necrosis, characterized by the presence of cells with pycnotic nucleus, hypertrophied cells and absence of cytoplasmic coloration. After 1 and 2 days of exposure, the liver showed focal areas of necrosis, however after 7 and 15 days of treatment, those necrosed regions occupied larger dimensions along the tissue, mainly close to the intrahepatic exocrine pancreas. The kidney of exposed fish showed reduction of cytoplasmic coloration in the convoluted tubules cells and it still observed thickening of glomerular capsule and glomerular collapse expanding the Bowman's space. Fish exposed to concentration 0.025 mg/L did not showed alterations in the branchiae structure in relation to the control group. However, fish exposed to 0.05 and 0.1 mg/L of trichlorfon showed histological alteration in gills in relation to the control and 0.025 mg/L groups, such as: hiperplasia of lamellar cells; subepithelial edema and lamellar fusion; telangiectasia and congestion in some areas.

Key words – organophosphorus, trichlorfon, fish, pesticide, histopathology

1. INTRODUÇÃO

Os praguicidas são compostos químicos usados pelo homem para destruir, repelir ou mitigar pragas, animais, fungos, plantas daninhas terrestres e aquáticas, podendo causar danos à saúde das pessoas, dos animais e ao meio ambiente. Podem ser classificados correlacionando o organismo envolvido no seu emprego com a sua estrutura química. Neste contexto, os organofosforados estão incluídos nos grupos dos inseticidas organosintéticos, fungicidas, nematicidas e acaricidas (LARINI, 1999).

Os organofosforados são amplamente utilizados na agropecuária, finalizando seu percurso, muitas vezes, em águas dos rios e mares causando problemas ambientais e intoxicações para os peixes e organismos aquáticos de acordo da sua toxicidade, dosagem e tempo de exposição. Apesar do problema da contaminação da água, os organofosforados são utilizados na piscicultura para controle de ectoparasitos. O organofosforado triclorfom é usado no controle de crustáceos, copépodos e cladóceros planctônicos, mas não afeta rotíferos e fitoplâncton (MARTINS, 1998). O triclorfom é usado também para erradicar trematódeos de extensiva gama de espécies de peixes (JUAREZ & ROUSE, 1983).

Há muitas formas de analisar os efeitos de substâncias que agridem o ambiente e uma delas seria o estudo da relação causa-efeito por meio da realização de bioensaios para pesquisar as alterações histopatológicas em peixes (RAND & PETROCELLI, 1985; STRAUS & CHAMBERS, 1995).

O organismo animal responde a estímulos por meio do sistema nervoso central e organiza a defesa biológica, HASCHEK & ROUSSEAU (1996) relataram que muitas vezes na tentativa de se defender do estresse provocado por um xenobiótico, a célula acaba se prejudicando, respondendo à injúria celular de modo reversível ou letal. A morte celular ocorre por mecanismos de necrose ou apoptose. Na injúria aguda reversível, as células apresentam-se hipertrofiadas, com sinais de esteatose, podendo apresentar também alterações na permeabilidade da membrana.

Assim, torna-se necessário avaliar aspectos histopatológicos de peixes para o monitoramento de contaminação ambiental. As primeiras respostas histopatológicas

associadas aos organofosforados normalmente acontecem no fígado, pois é o órgão responsável pelo metabolismo de substâncias tóxicas em geral (FANTA et al., 2003). Segundo INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (1992), a capacidade dos praguicidas em provocar lesões depende da sua toxicidade, dosagem e tempo de exposição sendo que o potencial tóxico do triclorfom para peixes e sua eficiência no controle dos ectoparasitos são atenuados sob condições de elevada temperatura, pH e alcalinidade total da água.

Os organofosforados, mesmo em níveis subletais, provocam várias alterações em diferentes níveis de organização biológica (bioquímicos, morfológicos e fisiológicos) dos peixes, implicando na diminuição da capacidade de vida dos animais devido lesões branquiais e hepáticas, capacidade de competição por alimentos e baixa resistência a doenças que poderão alterar a composição da fauna local, levando a conseqüências ecológicas (FANTA et al., 2003).

Estudos em organismos aquáticos tem demonstrado que o triclorfom pode causar vários efeitos subletais tais como o efeito agudo em baço de *Prochilodus scrofa* (RODRIGUES et al., 1997), toxicidade aguda em *Macrobrachium rosenbergii* (JUAREZ & ROUSE (1983), alterações hematológicas em *Cyprinus carpio* (RANZANI-PAIVA et al. 1987), alterações hematológicas em *Prochilodus scrofa* (RANZANI-PAIVA et al. 1997), lesões histopatológicas em fígado de *Prochilodus lineatus* (RODRIGUES et al. 2001), e parâmetros hematológicos e atividade da acetilcolinesterase em *Cyprinus carpio* (CHANDRASEKARA & PATHIRATNE, 2005).

RODRIGUES et al. (2001) avaliaram as alterações histológicas em fígado de curimatá (*Prochilodus lineatus*) expostos a 0,2 µL/L de triclorfom após 24 e 48 horas de exposição e observaram migração lateral do núcleo dos hepatócitos, núcleos com vários diâmetros e diferentes graus de densidade, picnose e necrose. RODRIGUES et al. (1998) observaram o fígado de *Brachydanio rerio* após 24 horas de exposição ao organofosforado Dimetoato na concentração de 0.025 µL/L e concluíram que houve descentralização de alguns núcleos dos hepatócitos, aumento da granulação do citoplasma seguida de necrose.

O fígado pode ser considerado como órgão biomarcador da poluição ambiental e, por isso, pode ser usado para estudo de parâmetros ambientais e biológicos, sendo que seu metabolismo pode ser alterado devido a vários fatores: alimentos, poluentes, toxinas, metais pesados, parasitas e microorganismos (BRUSLÉ & ANADON, 1996).

Nos teleósteos, o rim localiza-se dorsalmente, junto à coluna vertebral e é dividido em rim anterior, que contém na grande maioria dos peixes, tecido hematopoiético e rim posterior que possui os diversos túbulos (HEATH, 1995). GILL et al. (1988) observaram as lesões no rim de *Puntis conchoni* quando expostos ao dimetoato. Os efeitos patológicos foram mais evidentes nas células do epitélio renal, as quais incluíram hipertrofia, núcleo picnótico, inchaço de espaço de Bowman e colapso glomerular. FANTA (1991) relata que os organofosforados induzem separação das células dos túbulos renais e degeneração da cápsula.

As brânquias dos peixes exercem funções vitais na respiração, osmorregulação e excreção, podendo também oferecer subsídios a estudos de impacto ambiental, porque é um órgão em contato direto com a água e podem desenvolver patologias tais como degeneração vacuolar, necrose, alterações nas células pilares e hemorragias (HIBIYA, 1982). As brânquias são divididas em arcos branquiais e esses são constituídos por filamentos que exercem a função das trocas gasosas (BALDISSEROTTO, 2002). Segundo FANTA et al. (2003), a desorganização branquial diminui a eficiência na absorção do oxigênio.

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos histopatológicos das concentrações subletais do triclorfom em fígado, rim e brânquias de pacu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foi o peixe utilizado nesse bioensaio, sem distinção de sexo. O experimento foi realizado com exemplares jovens, divididos em lotes homogêneos e isentos de contato prévio com agrotóxicos, no biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Estadual Paulista da FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP.

O padrão analítico do triclorfom foi adquirido da Sigma (96%). Nome químico: Dimetil (2, 2, 2 - tricloro – 1 – hidroxietil) fosfonato CAS [52-68-6]. Nome comercial: Triclorfom, Dipterex, Tugon, Neguvon, etc.

No experimento foram utilizados 120 espécimes de pacu, com peso corpóreo médio de 75 g. Os peixes foram selecionados, pesados e aclimatados em caixas de amianto revestidas com tinta epóxi, com capacidade de 100 L, pelo período de duas semanas visando à detecção de parasitos, doenças e recuperação do estresse da captura e transporte. As condições ambientais foram monitoradas e os parâmetros avaliados foram: temperatura de $26,9 \pm 0,4$ °C; pH $7,7 \pm 0,1$; oxigênio dissolvido $8,8 \pm 0,5$ mg/L; alcalinidade 146 ± 11 mg/L; dureza 34 ± 5 mg/L; amônia não ionizada $0,12 \pm 0,1$ mg/L onde não foram observadas alterações que pudessem interferir nos resultados. A temperatura e o oxigênio dissolvido foram quantificados com oxímetro da marca Instrutherm, mod MO-890. O pH com pHâmetro da marca HANNA. A dureza da água foi calculada pelo método titulométrico com EDTA (APHA, 1991), a alcalinidade pelo método titulométrico (GOLTERMANN et al. 1978) e a amônia não ionizada pelo reagente de Nessler.

Durante esse período, a alimentação oferecida foi ração comercial. Foram realizados testes preliminares para determinação da concentração letal do triclorfom ($Cl_{50,96h}$). Com base no intervalo compreendido entre a maior concentração não letal e a menor concentração letal dos testes preliminares, foi possível determinar as concentrações usadas no experimento: 0,0 – 0,025 – 0,05 – 0,1 mg/L. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos (concentrações) e 3 repetições/tratamento.

Os efeitos subagudos do triclorfom nos peixes foram avaliados aos 1, 2, 7 e 15 dias. Para a exposição à droga o fluxo de água foi interrompido por 24 horas, sendo mantida a oxigenação. Após as 24 horas iniciais de exposição, foi realizado a primeira coleta (1 dia) e o fluxo de água foi restabelecido em todas as caixas na vazão de 400 mL/ min até o final do experimento. Nos dias de coleta, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas. Nas coletas 1 e 2 dias, três peixes por repetição foram sacrificados para a retirada do material biológico (n=9). Entretanto nas coletas dos 7 e 15 dias foram

retirados 2 exemplares/repetição (n=6). Os peixes foram capturados e imediatamente anestesiados com benzocaína adicionada na água na concentração de 1g/15L (CARNEIRO & URBINATI 2001). Em seguida, foi realizada a incisão na região ventral do corpo para proceder a retirada do fígado, rim e brânquias. A análise histológica foi realizada no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da FCAV - UNESP – Jaboticabal.

Os órgãos foram coletados em porções de tamanhos compatíveis para a obtenção de uma boa fixação (4,0 mm de espessura). A fixação foi feita por imersão em solução fixadora de Bouin, durante vinte e quatro horas. Os fragmentos colhidos foram processados na rotina histológica (desidratação em etanol em séries crescentes de concentração, diafanização em xilol, infiltração com a mistura xilol:parafina e inclusão final em parafina). Em seguida, os tecidos foram seccionados em micrótomo a uma espessura de 5,0 μm e as lâminas coradas pela Hematoxilina-Eosina (BEHMER et al., 1976). Após análise das lâminas e seleção dos cortes, esses foram fotodocumentados em fotomicroscópio AXIOSKOP – ZEISS.

3. RESULTADOS

3.1. Fígado

No tratamento controle, os hepatócitos do pacu apresentavam formas esférica ou hexagonal com o núcleo localizado na região mediana da célula, exibindo nucléolo e cromatina dispostos próximos a carioteca. O citoplasma dessas células mostrava uma leve coloração rósea. Os hepatócitos eram limitados por pequenos vasos sanguíneos conhecidos como capilares sinusóides. Esses formavam uma espécie de rede e os hepatócitos que eram encontrados ao redor dessa rede, estavam dispostos de forma cordonal. No fígado, encontrava-se a veia central que se ramificava em vênulas menores até formar os sinusóides (Figura 1- A).

Os condutos biliares eram formados por uma camada mucosa constituída por epitélio com células de formato cúbico e tecido conjuntivo. No tecido hepático foi possível observar entremeadas aos hepatócitos, células provenientes do tecido

pancreático exócrino. Essas células apresentavam formato arredondado e núcleo basal, constituindo o pâncreas exócrino intra-hepático (Figura 1 - B).

No tratamento com 0,025 mg/L de triclorfom, 1 dia após exposição, não foram observadas alterações histológicas em relação ao tratamento controle. Porém no mesmo tratamento, nas demais coletas, observou-se a perda do formato regular das células hepáticas, deslocamento do núcleo para a periferia da célula e ainda fusão celular. O arranjo cordonal dos hepatócitos foi o mesmo encontrado no tratamento controle (Figura 1 - C).

No tratamento com 0,05 mg/L de triclorfom, durante todo o período experimental foi observado que as células hepáticas também apresentaram perda do formato regular, deslocamento do núcleo para periferia e ainda perda no arranjo cordonal dos hepatócitos. Em algumas regiões do corte, observou-se células em processo de necrose, caracterizadas pela presença de células com núcleo picnótico, ausência de coloração no citoplasma e a presença de células hipertrofiadas. Na coleta 1 e 2, o fígado dos peixes apresentou áreas de necroses focais, que na terceira e quarta coleta aumentaram de extensão, principalmente nas proximidades do pâncreas exócrino intra hepático. Nos exemplares que foram expostos à concentração de 0,1 mg/L, verificou-se alterações similares às descritas para o tratamento com 0,05mg/L, porém com maior severidade ao longo dos dias após o tratamento (Figura 1 – D e E). O tecido hepático dos animais apresentou muitos focos de necrose.

3.2. Rim

O tecido renal dos peixes do tratamento controle, apresentava-se envolvido por uma delgada cápsula de tecido conjuntivo frouxo. O rim era composto pelos néfrons e tecido hematopoiético. Cada néfron era constituído pelo glomérulo, cápsula glomerular, túbulo coletor e túbulos contorcidos proximais e distais.

O corpúsculo renal era formado pelo glomérulo e pela cápsula glomerular, esta constituída por células achatadas dispostas em duas camadas, uma externa e outra interna que envolvia o glomérulo. Entre o glomérulo e a cápsula glomerular, foi observado o espaço capsular (Figura 2 - A).

Os túbulos contorcidos proximais e distais formados por células cuboidais, núcleos esféricos localizados na região central ou basal das células, com um ou mais nucléolos. As células dos túbulos contorcidos proximais possuíam microvilos densamente arranjados no lúmen e com maior afinidade pela eosina (acidófilo). As células dos túbulos contorcidos distais não mostravam microvilos (Figura 2– B).

Nos exemplares do tratamento com 0,025 mg/L de triclorfom não foram observadas alterações no tecido renal. No tratamento com 0,05 mg/L de triclorfom, observou-se que o rim dos peixes apresentou, a partir do segundo dia de exposição, diminuição da coloração citoplasmática das células constituintes dos túbulos contorcidos e ainda foram observados espessamento da cápsula glomerular e colapso do glomérulo, criando um aumento do espaço pericapsular de Bowman. Observou-se também a presença de centros melanomacrófagos (Figura 2– C). No tratamento com 0,1 mg/L de triclorfom, observou-se as mesmas alterações encontradas no tratamento de 0,05 mg/L de triclorfom, porém nesse tratamento as modificações foram mais acentuadas e constatadas desde o primeiro dia de exposição ao agrotóxico (Figura 2- D).

3.3. Brânquias

Nos peixes do tratamento controle as brânquias, anatomicamente, eram constituídas por quatro arcos branquiais. Nesses, os filamentos delgados das brânquias originavam duas linhas que se uniram na base por um septo branquial. Os filamentos branquiais estavam alinhados formando as lamelas secundárias. Histologicamente, as lamelas secundárias mostravam-se recobertas por células epiteliais, tendo em seu interior células pilares, células mucosas e células de cloreto.

Os peixes expostos à concentração de 0,025 mg/L de triclorfom durante todo o período experimental, não apresentaram alterações na estrutura branquial em relação ao grupo controle. Porém, os peixes expostos aos tratamentos com 0,05 e 0,1 mg de triclorfom/L apresentaram alterações nas brânquias em relação ao grupo controle e 0,025 mg/L, tais como hiperplasia das células das lamelas primárias e secundárias, edema subepitelial em algumas áreas, fusão lamelar, telangiectasia e congestão em algumas regiões (Figura 3).

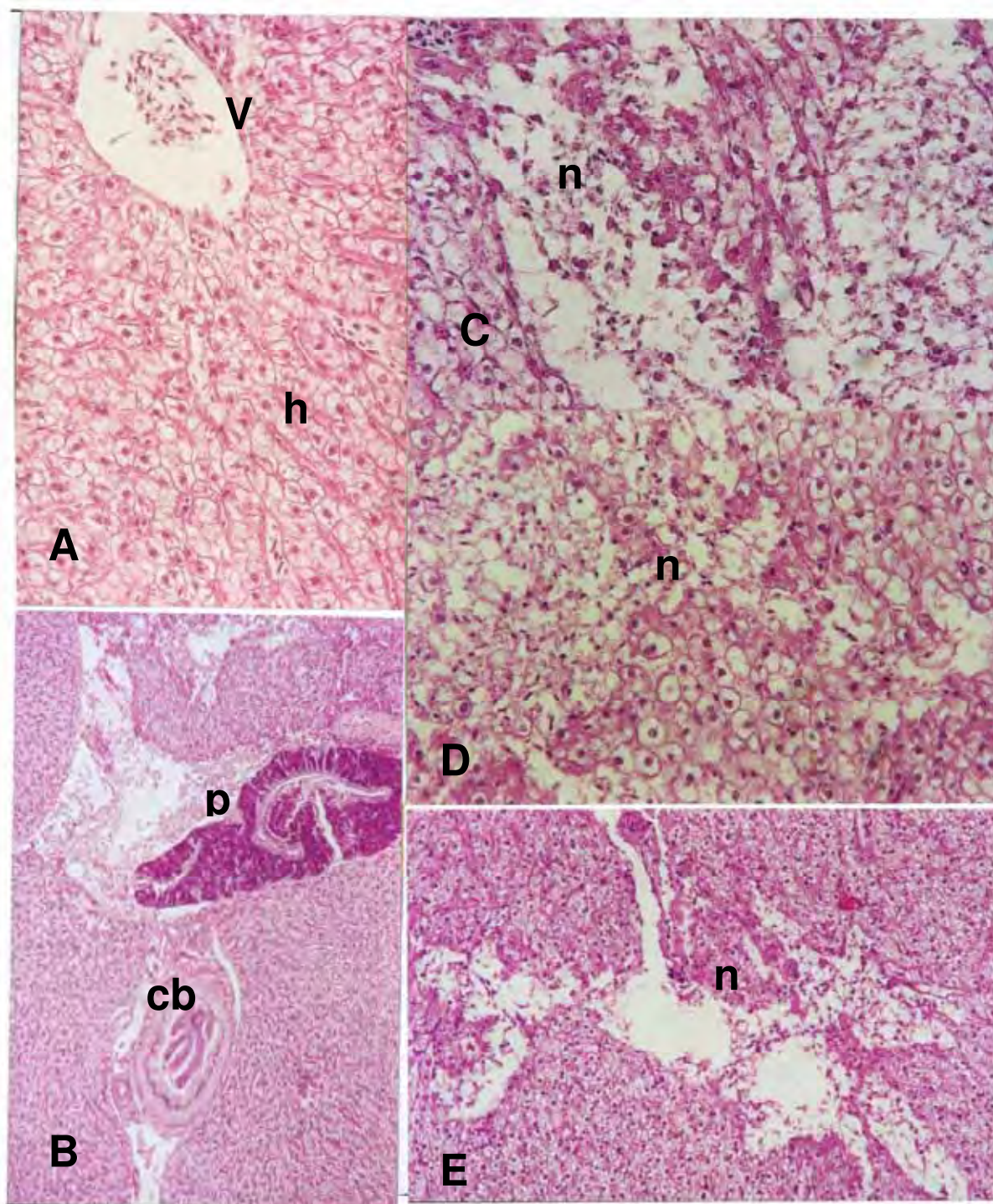


Figura 1. Fotomicrografia de fígado de pacu (HE). **A-** organização cordonal dos hepatócitos (h), veia centrolobular (v). Tratamento controle – 200x. **B -** pâncreas exócrino intra-hepático (p), conduto biliar (cb). Tratamento controle – 100x. **C –** áreas de necrose (n). Tratamento 0,025 mg/L (1 dia) – 400x. **D –** áreas de necrose (n). Tratamento 0,05 mg/L (7 dias) – 400x. **E –** áreas de necrose (n). Tratamento 0,1 mg/L (7 dias) – 200x.

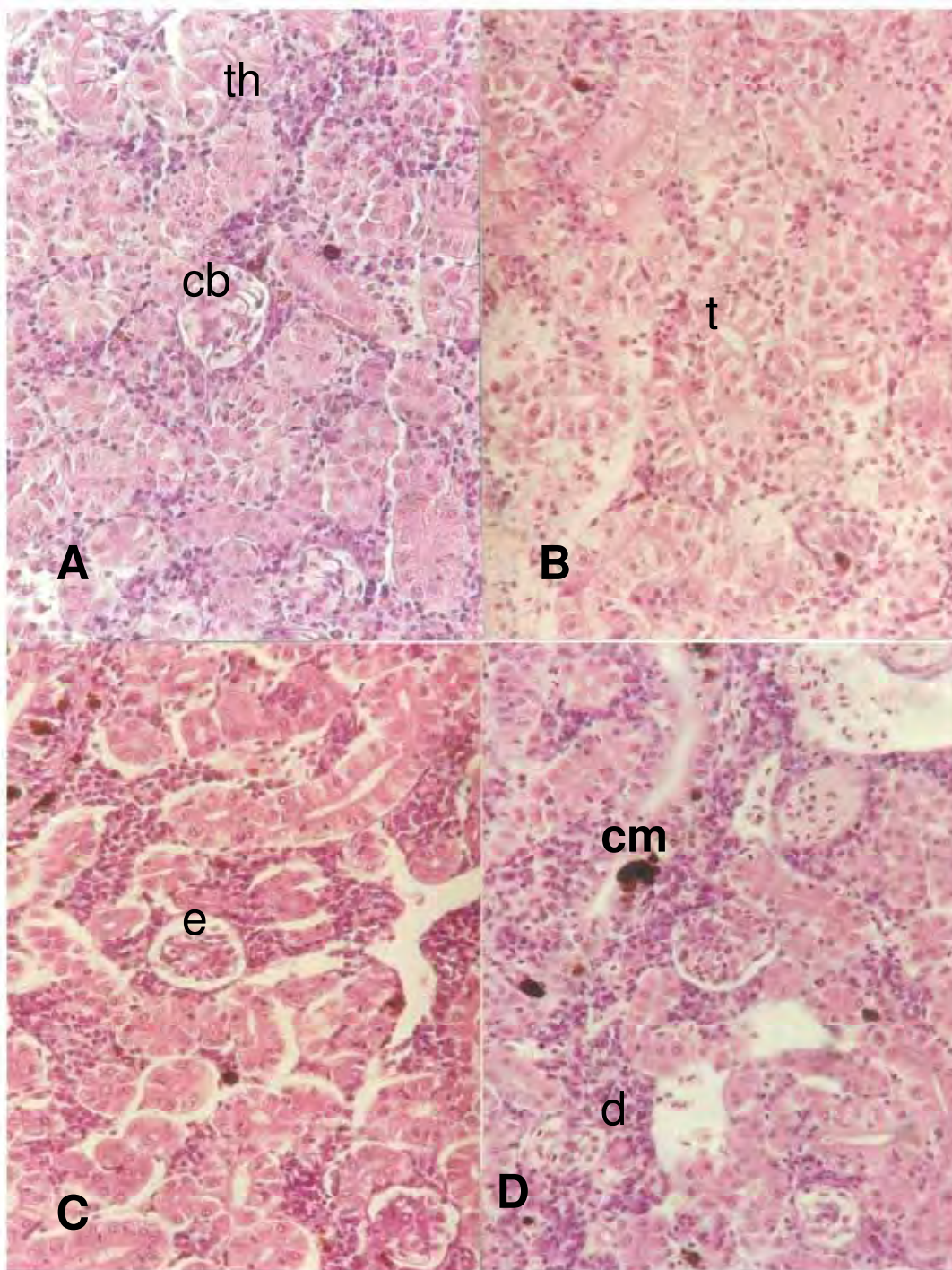


Figura 2. Fotomicrografia de rim de pacu (HE). **A** – organização do rim – cápsula de Bowman (cb), tecido hematopoético (th). Tratamento controle – 400x. **B** – Túbulos renais – Tratamento controle – 400x. **C** – Aumento do espaço pericapsular (e). Tratamento 0,05 mg/L (7 dias) – 400x. **D** – área com necrose e desarranjo do parênquima (d), centros melanomacrófagos (cm). Tratamento 0,1 mg/L (7 dias) – 400x.

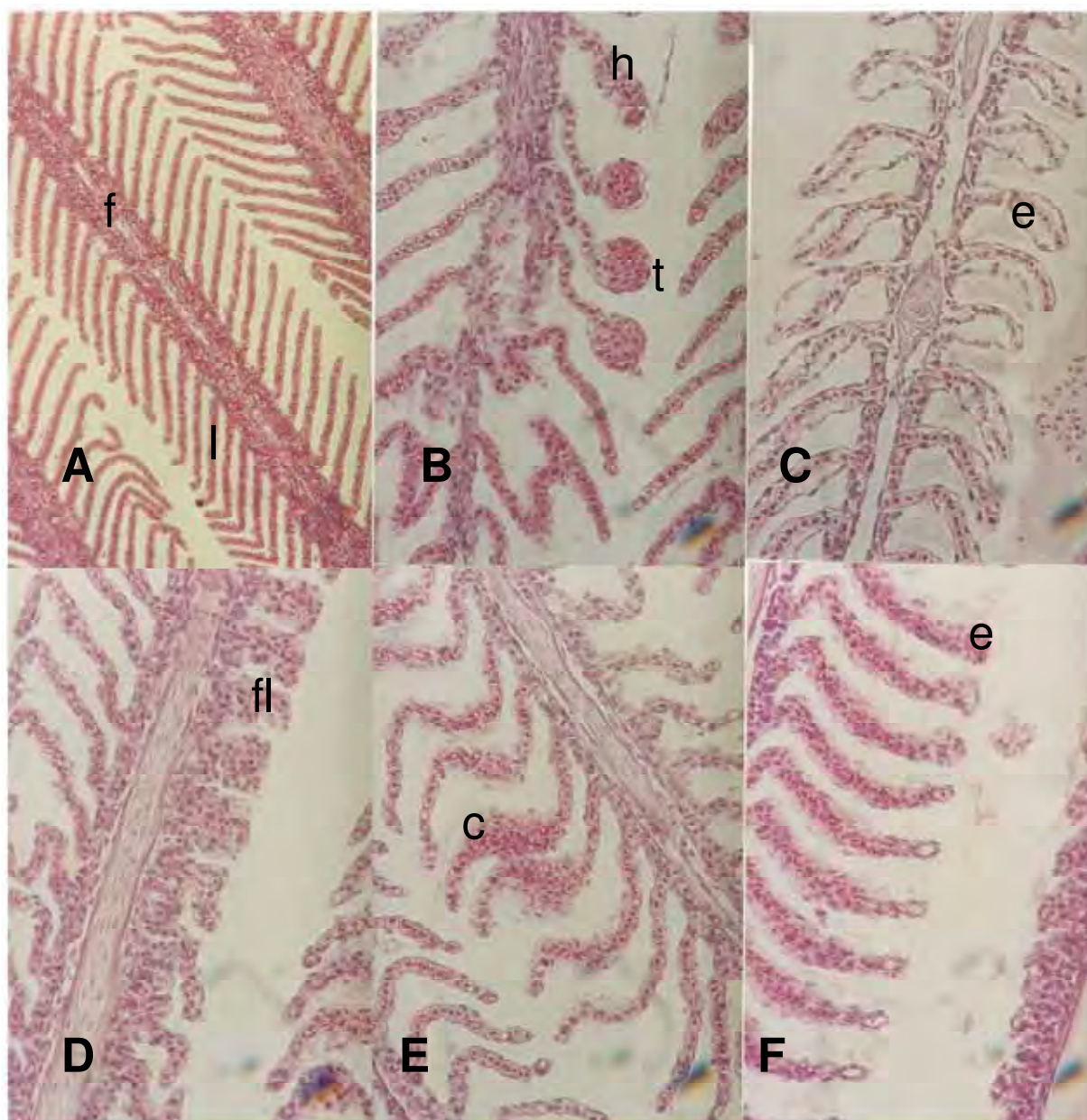


Figura 3. Fotomicrografia de brânquias de pacu (HE). **A.** organização dos filamentos (f) e lamelas (l) – Tratamento controle – 200x. **B.** telangiectasia (t), hiperplasia das células de revestimento interlamelar (h). Tratamento 0,05 mg/L (1 dia) – 400x. **C.** edema subepitelial nas lamelas (e). Tratamento 0,05 mg/L (1 dia) – 400x. **D.** fusão lamelar nas brânquias (fl). Tratamento 0,1 mg/L (1 dia) – 400x. **E.** congestão nas lamelas (c). Tratamento 0,1 mg/L (15 dias) – 400x. **F.** edema subepitelial nas lamelas (e). Tratamento 0,1 mg/L (1 dia) – 400x.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, a histoarquitetura hepática do grupo controle observada em *Piaractus mesopotamicus*, é semelhante à observada em *Salmo gairdneri* por HAMPTON et al. (1988), como também na maioria dos teleósteos descrita por HAMPTON et al. (1985) e HIBIYA (1982).

No pacu, como nos demais teleósteos, o tecido pancreático acompanha a veia porta a partir do momento em que ela emerge da serosa intestinal (ARANA, 1991). Nesta pesquisa, no tecido hepático, é possível observar entremeadas aos hepatócitos, células provenientes do tecido pancreático exócrino. YOUSON & AL-MAHROUKI (1999) relataram que, nos teleósteos, a diversidade estrutural do pâncreas exócrino é grande e o aspecto mais comum é o pâncreas exócrino difuso que se distribui entre os ductos biliares e vesícula biliar, vasos sangüíneos abdominais, trato gastrointestinal e no fígado.

O fato do fígado ser um dos locais mais ativos no processo da metabolização e na tentativa de neutralização dos efeitos do organofosforado em doses subletais, nas primeiras horas após exposição ao triclorfom, notou-se a ocorrência da migração dos núcleos para a periferia, seguida de hipertrofia das células e necrose, concordando com relatos de FANTA (1991). RODRIGUES et al., (1998) também observaram necrose focal no tecido hepático em *Brachydanio rerio*.

FANTA et al. (2003), analisando os efeitos da contaminação do metil paration em *Corydoras paleatus*, constataram que a forma dos hepatócitos tornou-se irregular, os núcleos estavam em uma posição lateral, próximos à membrana da célula e alguns mostraram-se picnóticos, com cromatina densa e necrose focal.

GILL et al. (1988), observando fígado de *Puntius conchonius* notaram que os hepatócitos estavam hipertrofiados e vacuolizados quando expostos a baixa concentração do carbamato carbaril (0,194 mg/L por 15 dias), porém na concentração de 0,306 mg/L após 30 dias da exposição, apresentaram picnose e necrose focal. Várias vacuolizações e picnoses nucleares ocorreram no fígado dessa mesma espécie exposta à concentração de 0,434 mg/L de dimetoato (60 dias) e desarranjo dos

cordões hepáticos e necrose, na concentração de 0,683 mg/L de dimetoato. As diferentes lesões hepáticas descritas nesses estudos assim como as constatadas no presente trabalho podem ser atribuídas a diversidade de espécies usadas em diferentes produtos e tempos de exposição.

CRUZ (2005) observou, em fígado de pacu exposto ao organofosforado metil paration, a presença de congestão, hipertrofia dos hepatócitos, desorganização do arranjo cordonal e necrose. Considerando que, neste estudo, as alterações observadas no tecido hepático de pacu são semelhantes às aquelas verificadas em outros estudos de fígado de outras espécies de peixes expostos a organofosforados, conclui-se que o triclorfom tem relação com as alterações hepáticas pois os hepatócitos podem ser considerados alvos da toxicidade dos organofosforados caracterizando o fígado como órgão biomarcador da poluição ambiental.

O aspecto histológico do rim descrito para os peixes do tratamento controle nesse estudo está de acordo com o descrito por HIBIYA (1982). Descrições de alterações renais por diferentes trabalhos expostos a uma variedade de praguicidas estão de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho. FANTA (1991) relatou que algumas substâncias são transformadas em outros compostos e são posteriormente eliminado pelo rim, conseqüentemente afetando a cápsula de Bowman.

ANEES, (1976) descreveu várias lesões incluindo mudanças degenerativas e necrose no epitélio tubular e grande aumento dos centros melanomacrófagos. Em peixes a principal localização dos melanomacrófagos é observada na derme, hipoderme, rim, fígado e pequenos grupos de células do sangue e vasos linfáticos (AGIUS & ROBERTS, 1981).

GILL et al. (1988) observaram as lesões no rim de *Puntius conchoni* causadas pela exposição ao dimetoato. Os efeitos patológicos mais evidentes foram hipertrofia das células do epitélio renal, além de picnose, inchaço do espaço de Bowman e colapso glomerular.

As alterações histológicas nas brânquias provocadas pelo triclorfom foram similares às descritas por FANTA et al. (2003), onde as brânquias de *C. paleatus* após exposição ao organofosforado exibiram edema subepitelial e desorganização da

estrutura branquial. RICHMONDS & DUTTA (1989), observaram além do edema subepitelial, fusão lamelar e necrose em *L. macrochirus* exposto ao organofosforado.

HIBIYA (1982) relatou que muitos agentes patológicos podem produzir alterações histológicas nas brânquias, como edema e hiperplasia epitelial das lamelas secundárias, infiltração de células epiteliais, fusão lamelar, como também a morte de células mucosas, devido a longos períodos de hipersecreção de muco; alterações estas decorrentes de uma resposta defensiva crônica à infecções parasitárias, bacterianas ou à irritantes químicos.

Os efeitos histopatológicos nas brânquias provocadas pelo triclorfom foram similares às descritas por CRUZ (2005). Segundo este autor, o organofosforado paration pode ter atingido as brânquias do pacu pela superfície externa da lamela secundária e pela corrente circulatória ocorrendo congestão nas lamelas secundárias, edema subepitelial, telangiectasia e desorganização da lamela secundária.

Os resultados obtidos neste estudo, mostraram alterações significativas nas brânquias que são importantes órgãos para a manutenção do equilíbrio iônico e osmótico em peixes. A hipertrofia e hiperplasia das células resultam em aumento da distância de difusão água-sangue nas lamelas que pode dificultar a absorção de oxigênio do meio aquático e a excreção de gás carbônico (BALDISSEROTTO, 2002). O efeito secundário da desorganização da estrutura branquial é devido a menor eficiência na absorção de oxigênio e ao aumento da distância de difusão lamelar (FANTA et al., 2003).

As observações presentes neste trabalho permitem concluir que a espécie *Piaractus mesopotamicus* foi considerada um bom modelo biológico para este estudo, pois adaptou-se bem às condições laboratoriais e à manipulação durante o experimento. Mesmo em doses subletais, o triclorfom provocou efeitos histopatológicos no fígado, rim e brânquias de exemplares juvenis de pacu quando comparados ao grupo controle. As lesões observadas nos tecidos podem comprometer a capacidade de crescimento e desenvolvimento dos peixes e a qualidade do ambiente aquático quando expostos ao triclorfom.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, C. & ROBERTS, R.J. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. **Journal of fish biology**, London, 19:161-169, 1981.

ANEES, M.A. Intestinal pathology in a freshwater teleost, *Channa punctatus* exposed to sub-lethal and chronic levels of three organophosphorus insecticides. **Acta physiologica Latinoamericana**. Buenos Aires, v. 26, n.1, p. 63-67, 1976.

APHA – **Standart methods for the examination of water and wastewater**. Ed. Washington, D. C: American Public Association, 17 ed. USA, 1991. p. 81-143.

ARANA, S. Estrutura histológica do fígado de peixes. . In: SANTOS, H. S. F. dos. **Histologia de peixes**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 32-37.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: ed UFSM, 2002. 211 p.

BEHMER, O. A. TOLOSA, E.M.C., FREITAS-NETO, A,G,. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo, 1976. 256p.

BRUSLÉ, J., ANADON, G.G.The structure and function of fish liver. In **Fish Morphology**. Science Publishers, 300p. 1996.

CARNEIRO, P. C.; URBINATI, E. C. Plasma eletrolyte distunbance in matrinxã *Brycon cephalus*, (Teleos: Characidae) transported under influence of benzocaine, **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v. 11, n. 4, p. 321-326, 2001

CHANDRASEKARA, H. U.; PATHIRATNE, A.. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameter and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L.. **Aquaculture Research**, Inglaterra, v. 36, p. 144-149, 2005.

CRUZ, C. **Aspectos toxicológicos de parathion e de extrato aquoso de folhas secas de nim para o pacu e eficácia no controle de monogene.** (Tese de Doutorado), UNESP- Jaboticabal, 2005. 97p.

FANTA, E. Ação de poluentes sobre o tecido. In: SANTOS, H. S. L. dos. **Histologia de peixes.** Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 32-37.

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.** Paraná, v.54, n.2, p. 119-130, 2003.

GILL, T. S.; PANT, J.; PANT, J. Gill, Liver and kidney lesions associated with experimental exposures to carbary and dimethoate in the fish (*Puntius conchoni* Ham). **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology.** New York, v. 41, p. 71-78, 1988.

GOLTERMANN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh waters.** 2 ed. Oxford: Blackwell, 1978, 214 p.

HAMPTON, J. A.; CLARK, L.; GOLDBLATT, P.; LAUREN, D.J.; HINTON, D. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Liver: II. The biliary system. **The anatomical record**, Morgantown, v. 221, p. 619-634, 1988.

HAMPTON, J. A.; MCCUSKEY, R.; MCCUSKEY,R.; HINTON, D. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes. **The anatomical record**, Morgantown, v. 213, p. 166-175, 1985.

HASCHEK, W.M. E ROUSSEAU, C.G. **Fundamentals of Toxicologic Pathology**. Academic Press. London, 1996. 563p.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Florida, Lewis Publishers,1995. 331p.

HIBIYA, T. **An atlas of fish histology** . Normal and pathological features. New York: Kodansha Tokio, 1982. 147p.

INTERNACIONAL PROGRAME ON CHEMICAL SAFETY. **Trichlorfon (EHC 132, 1992)** 95p. Disponível em: < www. Who. Int/das/ cat. 97/ zehc 2. htm.# n_o 132: Trichlorfon>. Acesso em: 12 jan. 2003.

JUAREZ, L. M.; ROUSE, D. B. Acute toxicity of trichorfon to juvenile freshwater prawn. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda,M.D., v. 45, n. 4, p. 214-216, 1983.

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. Editora: Manole. São Paulo, 1999. 230p.

MARTINS, M., M. **Doenças infecciosas e parasitárias de peixes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 1998. 61p.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Washington: G.M. Rand &; S.R. Petrocelli eds. 1985. 665p.

RANZANI-PAIVA, M.T.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELLA, M. C.; CELIBERTO, R. J. Hematologia da carpa *Cyprinus carpio* infestada por *Argulus sp* e após um tratamento

com fosfonato de 0,0- dimetil – oxi – 2,2,2- tricloroetil (Neguvon). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 14, p.83-92, 1987.

RANZANI-PAIVA, M.T.; RODRIGUES, E.L.; EIRAS, A.C.; VEIGA, M. L.; PACHECO, F. J. Alterações Hematológicas em Curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Trichlorfon). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.24, p.187-196, 1997.

RICHMONDS, C. e DUTTA, H.M. Histopathological changes induced by Malathion in gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 43, p. 123-130, 1989.

RODRIGUES E. L.; RANZANI – PAIVA, M. J.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L.; EIRAS, A. C. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 24, p.197-203, 1997.

RODRIGUES E. L.; RANZANI – PAIVA, M. J.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L. Histopathologic lesions in the liver of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to a sublethal concentrations of the organophosphate insecticide Dipterex 500® (Trichlorfon). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n.2, p. 503-505, 2001.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E.; RODRIGUES, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.15, n.2, p.441-450,1998.

STRAUSS, D. L.; CHAMBERS, J. E. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterase of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 33 p.311-324, 1995.

YOUSON, J. H.; AL-MAHROUKI, A.A. Ontogenetic and phylogenetic development of the endocrine pancreas (Islet Organ) in fishes. **General and Comparative Endocrinology**. San Diego, Calif. v. 116, p. 303-335, 1999.