

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**TOXICIDADE AGUDA E RESPOSTAS METABÓLICAS E HEMATOLÓGICAS
DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) EXPOSTO A
CONCENTRAÇÃO SUB-LETAL DE TRICLORFON E RECUPERAÇÃO**

FRANCINE PERRI VENTURINI

São Carlos – SP

- 2010-

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**TOXICIDADE AGUDA E RESPOSTAS METABÓLICAS E HEMATOLÓGICAS
DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) EXPOSTO A
CONCENTRAÇÃO SUB-LETAL DE TRICLORFON E RECUPERAÇÃO**

Francine Perri Venturini

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

Co-orientador: Dr. Claudinei da Cruz

São Carlos – SP

- 2010-

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

V469ta

Venturini, Francine Perri.

Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposto a concentração sub-letal de triclorfon e recuperação / Francine Perri Venturini. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

78 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Toxicologia. 2. Pacu (Peixe). 3. Inseticida organofosforado. 4. Marcadores biológicos. 5. Acetilcolinesterase. I. Título.

CDD: 615.9 (20^a)

*Aos meus amados pais, Vera e Antonio,
e à minha querida irmã Fabíola.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes pela orientação, função exercida com maestria. Por ter me ensinado a trabalhar de forma honesta e alegre. Agradeço a amizade e a leveza do ambiente de trabalho.

Ao Dr. Claudinei da Cruz pela competente co-orientação e pela pareceria desde o início de minha experiência acadêmico-científica.

Aos componentes da banca examinadora, pelas valiosas contribuições.

Aos meus pais Vera e Antonio pela base sólida que recebi. O conhecimento acadêmico se apequena frente ao que me ensinaram.

À minha irmã Fabiola, pela grande amizade. Seu exemplo foi fundamental para que meus anseios profissionais se concretizassem.

Ao meu cunhado Pablo, por ser sempre solícito e sorridente.

Aos meus tios Elsa e Roberto e às minhas primas Paloma e Natália, pelo apoio e amor incondicional. À pequena Heleninha, pela alegria vinda com sua chegada.

Aos queridos amigos do Laboratório de Bioquímica Adaptativa: Araceli, Fernanda, Fernando, Gustavo, Japinha, Josi, Juliana, Lívia, Lícia, Lucas, Luciana, Priscila e Timba pela disponibilidade e pelos bons momentos compartilhados. Agradeço especialmente ao Rodrigo e à Ive, que tantas vezes me ajudaram a pensar claramente.

Aos amigos da 1º turma de Ciências Biológicas da Unesp – Jaboticabal.

Ao Prof. Dr. Robinson A. Pitelli, por ceder o local para realização dos experimentos.

Aos amigos e funcionários do NEPEAM, sem os quais este trabalho não seria possível. Agradeço o acolhimento, a disponibilidade e grande auxílio no período experimental.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares, pelas análises de qualidade de água.

À Camila Prata e Joice Brigati, amigas sempre presentes.

Ao Rubens, pelo imenso carinho e companheirismo.

À Natália Sayuri, pela alegria compartilhada em nosso lar. À Ana Paula, por ter me recebido tão bem em São Carlos.

Aos professores do PPGGEv, pelos conhecimentos compartilhados e às secretárias do PPGGEv, pela gentileza e prontidão.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao processo nº 07/57927-8.

Obrigado!

RESUMO

As doenças causadas por parasitas em peixes são um problema relevante na aquicultura. Assim, os organofosforados (OPs), incluindo o triclorfon [dimetil (2,2,2 – tricloro- 1 hidroxietil) fosfonato] são utilizados para controle de ectoparasitos na aquicultura atual. Devido à utilização do triclorfon no controle de parasitoses em peixes, incluindo o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) na aquicultura brasileira e mundial, justifica-se a necessidade de ampla abordagem de estudo deste organofosforado relacionada à sua toxicidade e efeitos nos parâmetros bioquímicos metabólicos. Assim, os objetivos deste trabalho foram: determinar a concentração letal (CL (I)50;96h) do triclorfon para o pacu e avaliar os efeitos histológicos desta exposição; determinar e avaliar suas respostas metabólicas após exposição sub-letal ao triclorfon (10% da CL (I)50;96h); e avaliar suas respostas metabólicas após recuperação de 7 e 14 dias. A CL (I)50;96h encontrada para alevinos de pacu foi de 0,04 mgL⁻¹ de triclorfon, e para jovens foi de 0,07 mgL⁻¹ de triclorfon. A avaliação histológica branquial revelou alterações adaptativas, visando diminuir a entrada do xenobiótico; no fígado houve alterações de aumento de fluxo sanguíneo, visando maior eficiência de desintoxicação; no rim as alterações foram indicativas de aumento de excreção e na pele houve migração de cromatóforos para as camadas mais superficiais. Após a exposição sub-letal, o pacu apresentou redução da hemoglobina total, enquanto que após a recuperação de 7 dias houve redução na HCM e após a recuperação de 14 dias ocorreu redução do hematócrito. As alterações metabólicas observadas nos três períodos analisados indicam esforços a fim de manutenção homeostática através de produção de energia. A atividade da AChE cerebral e muscular apresentou queda, sendo recuperada após os 14 dias em água livre do xenobiótico.

Palavras-chave: pacu, triclorfon, organofosforado, biomarcadores, metabolismo, acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Parasitosis in fishes is a relevant problem in aquaculture. Besides, the organophosphate trichlorfon (2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate) is amongst the most used medicine in farming of fishes. Due to trichlorfon use in fish parasitosis control, including pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in brazilian and worldwide aquaculture, it is necessary to study the effects of this organophosphorus compound related to toxicity and metabolic biochemical parameters. The aim of this work was to evaluate trichlorfon acute toxicity (LC(I)50;96h) to *P. mesopotamicus* and histopathological effects of this exposition; detect metabolic changes in juvenile pacu (*P. mesopotamicus*) exposed to trichlorfon sub-lethal concentration (10% LC (I) 50;96h); and evaluate metabolic changes after seven and 14 days of recovery. Estimated (LC (I)50;96h) of trichlorfon to alevin was 0.04mg/L; to juvenile fish was 0.07 mgL⁻¹. Histological evaluation showed adaptive alterations, aiming to limit xenobiotic entrance; liver alterations aimed an increase in blood influx, consequently increasing detoxication; kidney alterations indicate excretion increase and skin presented cromatophore migration to superficial folds. After sub-lethal exposure, pacu presented a decrease in hemoglobin, after seven days recovery it was recorded a decrease in MCH and after 14 days recovery analysis showed a decrease in hematocrit. Metabolic alterations observed after sub-lethal expositions and recovery indicated efforts aiming to homeostatic maintenance trough energy production. Brain and muscle AChE activity decreased, regaining the control values after 14 day of recovery in xenobiotic free water.

Key-words: pacu, trichlorfon, organophosphorus, biomarkers, metabolism, acetylcholinesterase.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 5 |
| 2.1. Estresse em peixes..... | 5 |
| 2.2. Ferramentas diagnósticas..... | 6 |
| 2.3. Triclorfon | 11 |
| 2.4. Biotransformação | 13 |
| 2.5. <i>Piaractus mesopotamicus</i> | 15 |
| 3. OBJETIVO | 17 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 4.1. Toxicidade aguda (CL50;96h) do triclorfon para pacu jovem e adulto | 18 |
| 4.2. Avaliação histológica..... | 19 |
| 4.3. Exposição sub-letal ao triclorfon e recuperação | 19 |
| 4.4. Determinação dos parâmetros hematológicos..... | 20 |
| 4.4.1. Hematócrito..... | 20 |
| 4.4.2. Hemoglobina total | 21 |
| 4.4.3. Contagem de eritrócitos (RBC)..... | 21 |
| 4.4.4. Volume corpuscular médio (VCM) | 21 |
| 4.4.5. Hemoglobina corpuscular média (HCM) | 21 |
| 4.4.6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)..... | 21 |
| 4.5. Quantificação de intermediários metabólicos em tecido e plasma sanguíneo..... | 22 |
| 4.5.1. Ácidos graxos livres | 22 |
| 4.5.2. Amônia..... | 22 |
| 4.5.3. Aminoácidos livres | 23 |
| 4.5.4. Glicose..... | 23 |
| 4.5.5. Lactato | 23 |
| 4.5.6. Piruvato..... | 23 |
| 4.5.7. Proteína | 23 |
| 4.5.8. Triacilgliceróis | 24 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.6. | Glicogênio | 24 |
| 4.7. | Determinações enzimáticas | 24 |
| 4.7.1. | Acetilcolinesterase (AChE) | 25 |
| 4.7.2. | Alanina aminotransferase (ALAT) | 25 |
| 4.7.3. | Aspartato aminotransferase (ASAT) | 25 |
| 4.7.4. | Fosfatase ácida (FAC) | 26 |
| 4.7.5. | Fosfatase alcalina (FAL) | 26 |
| 4.7.6. | Proteína no homogeneizado de tecidos..... | 27 |
| 4.8. | Análise estatística | 27 |
| 5. | RESULTADOS | 28 |
| 5.1. | Toxicidade aguda do triclorfon para alevino e juvenil de pacu | 28 |
| 5.2. | Efeito sub-letal do triclorfon em pacu durante de toxicidade aguda..... | 29 |
| 5.3. | Exposição sub-letal e recuperação de sete e 14 dias | 34 |
| 5.3.1. | Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos..... | 34 |
| 5.3.2. | Intermediários metabólicos e enzimas..... | 36 |
| 6. | DISCUSSÃO | 44 |
| 6.1. | Toxicidade aguda do triclorfon para jovens e adultos de pacu | 44 |
| 6.2. | Efeito sub-letal do triclorfon para o pacu durante o teste de toxicidade aguda | 46 |
| 6.3. | Exposição sub-letal e recuperação | 50 |
| 6.3.1. | Parâmetros hematológicos e parâmetros hematimétricos | 50 |
| 6.3.2. | Intermediários metabólicos e enzimas..... | 52 |
| 7. | CONCLUSÃO | 63 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |
| 9. | APÊNDICES | 77 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fórmula estrutural do triclorfon..... | 12 |
| Figura 2. Processos de disposição de químicos em organismos vivos | 13 |
| Figura 3. Exemplar de <i>Piaractus mesopotamicus</i> (HOLMBERG, 1887)..... | 16 |
| Figura 4. Relação concentração-mortalidade do triclorfon para o pacu durante o teste de toxicidade aguda. | 28 |
| Figura 5. Fotomicrografia de brânquia de pacu durante o teste de toxicidade aguda..... | 30 |
| Figura 6. Fotomicrografia de fígado de pacu durante o teste de toxicidade aguda | 31 |
| Figura 7. Fotomicrografia de rim de pacu durante o teste de toxicidade aguda.. | 32 |
| Figura 8. Fotomicrografia de pele de pacu durante o teste de toxicidade aguda. | 33 |
| Figura 9. Atividade específica da acetilcolinesterase cerebral e muscular de <i>P. mesopotamicus</i> exposto ao triclorfon por 96 horas..... | 38 |
| Figura 10. Atividade específica da acetilcolinesterase cerebral e muscular de <i>P. mesopotamicus</i> recuperado por 7 dias.. | 41 |
| Figura 11. Atividade específica da acetilcolinesterase cerebral e muscular de <i>P. mesopotamicus</i> recuperado por 14 dias. | 43 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Médias e desvios-padrão dos parâmetros hematológicos e dos índices hematimétricos do pacu após exposição ao triclorfon por 96 horas e após sete e 14 dias de recuperação..... 35
- Tabela 2.** Médias e desvios-padrão das variáveis metabólicas do fígado, músculo e plasma do pacu após 96 horas de exposição sub-letal ao triclorfon. 37
- Tabela 3.** Médias e desvios-padrão das variáveis metabólicas do fígado, músculo e plasma do pacu após a recuperação de sete dias. 40
- Tabela 4.** Médias e desvios-padrão das variáveis metabólicas do fígado, músculo e plasma do pacu após a recuperação de 14 dias. 42
- Tabela 5.** Valores de CL50;96h de espécies de peixes expostas ao triclorfon. 45

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos maiores problemas da aquicultura é a ocorrência de parasitos e patógenos nos animais de cultivo, o que acarreta grandes perdas na produção e na qualidade final do pescado. Assim, a saúde dos organismos de cultivo necessita de constantes cuidados contra esses bioagressores. O tratamento dos organismos de cultivo com produtos químicos resulta na liberação de grandes quantidades de substâncias ativas e de seus metabólitos no ambiente aquático (KINKELIN e MICHEL, 1992). Os organismos aquáticos, inclusive os peixes, são frequentemente expostos a pesticidas e seus derivados. A exposição raramente ocorre de locais de descarga pontuais, mas é comumente devida ao escoamento desses produtos pelo uso agrícola, doméstico ou mesmo por aplicações específicas no ambiente aquático (SCHLENK, 2005).

Dentre os vários xenobióticos utilizados para o controle de parasitos, os organofosforados (OP) têm destaque, pois constituem o grupo mais empregado na preparação de tanques de larvicultura, no controle de parasitos monogenéticos e no de insetos (HAI et al. 1997; PEÑA-LLOPIS et al. 2003; GUIMARÃES et al. 2007). No Brasil, o triclorfon na formulação Masoten[®] é regulamentado para ser utilizado no controle de ectoparasitos de peixes. Este inseticida organofosforado (OP) foi testado no controle de monogenéticos, *Ichthyophthirius multifiliis* e *Trichodinia* sp. em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e em tilápia (*Oreochromus niloticus*) (CRUZ e CUBO, 2008; CUBO et al. 2008), além de ser empregado no controle de *Laernea* sp., *Argulus* sp. e *Dolops* sp. Embora o uso do triclorfon na aquicultura esteja regulamentado, estudos para verificar a toxicidade deste inseticida ainda são requeridos, visando estabelecer níveis seguros de utilização (MATAQUEIRO et al. 2008).

A toxicologia aquática é estimulada pela preocupação com a qualidade do meio ambiente, bem como com a qualidade de atividades de pesca recreativas e comerciais. O ambiente aquático é um dos últimos receptáculos de poluentes, e os organismos aquáticos, especialmente os que se encontram nos pontos mais altos da cadeia alimentar, são, devido à bioconcentração e à biomagnificação, muitas vezes sujeitos a alta carga de poluentes (WESTER e VOS, 1994).

No ambiente de criação intensiva, os peixes enfrentam situações muito diferentes das encontradas no ambiente natural, tais como altas densidades populacionais, alterações químicas na água, interação biológica entre peixes e microorganismos e práticas de manejo em geral. Estas novas situações estimulam diretamente os animais a desenvolverem mecanismos adaptativos, os quais podem ser eficientes dependendo do tempo de exposição dos animais às condições desfavoráveis (URBINATI e CARNEIRO, 2004). As condições adversas do ambiente aquático, como a presença de xenobióticos, podem levar os peixes a uma condição de estresse.

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período, geralmente de um a quatro dias. Os critérios de avaliação são a mortalidade para peixes e imobilidade para invertebrados. Uma das formas de se expressar os resultados é em CL50 (Concentração Letal para 50% de uma determinada população) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Quando um tóxico entra em contato com um organismo, várias respostas fisiológicas e bioquímicas ocorrem, as quais podem ser adaptativas ou levar à toxicidade. Os processos bioquímicos representam os eventos mais precoces e mais sensíveis dos danos causados por xenobióticos. Assim, é importante determinar os efeitos desses produtos químicos e interpretá-los em termos bioquímicos, para delinear os mecanismos de ação do poluente, e possíveis vias de tornar os efeitos adversos menos severos (BEGUM, 2004).

Quando um produto químico é utilizado em tratamentos para controle de ectoparasitos de peixes, ele é absorvido, principalmente, pelas brânquias e superfície corporal e pode produzir tanto efeitos letais como sub-letais nos animais (VARÒ et al. 2003). As respostas dos organismos aquáticos aos inseticidas OPs dependem do tipo do composto, do tempo de exposição, da qualidade da água e da espécie (FISHER, 1991).

Um dos principais efeitos dos OP tanto em organismos invertebrados como em vertebrados, é a inibição da acetilcolinesterase (AChE), que provoca estimulação contínua e excessiva do nervo e das fibras musculares, podendo

causar paralisia e morte (WALSH et al. 2007).

Além da AChE, outras enzimas podem ser utilizadas para avaliar os efeitos biológicos de OP em tecidos e no metabolismo de peixes (AGUIAR et al. 2004). Os efeitos inibidores dos OP dependem de sua capacidade de ligação no sítio ativo da enzima e de sua taxa de fosforilação em relação ao comportamento e à idade dos animais (DUTTA et al. 1995). Em estudos toxicológicos de exposição subaguda, as alterações nas atividades enzimáticas refletem diretamente os distúrbios metabólicos e danos celulares em órgãos específicos (CASILLAS et al. 1983).

A perturbação, por xenobióticos, de processos vitais em níveis molecular e sub-celular de organização biológica, frequentemente leva a danos celulares que resultam em doenças degenerativas e neoplásicas nos órgãos alvo. Assim, a avaliação histopatológica é útil como indicador complementar de toxicidade (PACHECO e SANTOS, 2002). As pesquisas histopatológicas são capazes de diferenciar lesões causadas por doenças e por outros fatores ambientais daquelas lesões devidas à exposição a poluentes (SCHWAIGER et al. 1997).

A avaliação ecotoxicológica de qualquer xenobiótico a ser utilizado no ambiente aquático é fundamental para a regulamentação do seu uso e da sua classificação quanto ao potencial de risco ambiental. A identificação do perigo e a avaliação da relação concentração-resposta são etapas iniciais no processo (USEPA, 2002). Deste modo, estudos de toxicidade aguda são importantes na estimativa do risco ambiental do pesticida (PARMA de CROUX et al. 2002). Segundo Lackner (1998), os peixes podem possuir as mesmas vias metabólicas para lidar com os efeitos tóxicos de agentes endógenos e exógenos que os mamíferos, sendo que o monitoramento das condições desses organismos aquáticos submetidos à exposição à xenobióticos pode ter implicações na saúde de outros animais.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie pertencente à família Characidae e subfamília Serrasalminae e destaca-se como organismo para a realização de testes de avaliação da toxicidade de xenobióticos, pois é uma importante espécie de cultivo. Além das excelentes características para a

aqüicultura, o pacu é hospedeiro natural de várias espécies de parasitos, necessitando de constante monitoramento e controle das infestações.

Atualmente, vários fármacos e produtos químicos são utilizados para o controle de parasitos e enfermidades de peixes, porém poucos estudos abordam os possíveis efeitos no metabolismo dos animais. Assim, devido à aplicação do triclorfon, na formulação Masoten[®], no controle de ectoparasitos na aqüicultura brasileira e mundial, este trabalho justifica-se pela necessidade de ampla abordagem dos efeitos deste produto relacionado com a sua toxicidade e efeitos nos parâmetros bioquímico metabólicos do pacu (*P. mesopotamicus*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estresse em peixes

Devido à expansão da piscicultura, observa-se um crescente interesse no que concerne aos prejuízos causados por mortalidade e problemas na produção intensiva de peixes. Entre os aspectos importantes para a adequada viabilização e otimização dos sistemas de criação, estão aqueles que afetam o desempenho e, conseqüentemente, a produção de peixes (URBINATI e CARNEIRO, 2004). O estresse de manuseio, estocagem, transporte, pH, qualidade de água e causado por xenobióticos na água é um dos principais fatores a ser considerado no que diz respeito às perdas na produção de peixes.

A definição de estresse é bastante ampla, mas há um consenso entre os estudiosos da área. Segundo Rottman e colaboradores (1992), o estresse pode ser definido como resultado dos fatores físicos ou químicos que causam reações corporais, as quais podem contribuir para o aparecimento de doenças e a morte do animal. Chrousos (1998) define o estresse como um estado de homeostase ameaçada, o qual é restabelecido por um complexo conjunto de respostas adaptativas fisiológicas e comportamentais do organismo. De acordo com Sancho e colaboradores (2009), o estresse é um mecanismo de compensação fisiológica que o organismo adota em resposta a um fator estressor. Quando o agente estressor excede o limite de tolerância para compensar a situação de estresse, ocorre a morte do organismo. As respostas adaptativas podem ser inadequadas para o restabelecimento homeostático ou podem ser excessivas e prolongadas; sendo que em ambos os casos, o animal não alcança um estado saudável e um estado patológico pode ocorrer (CHROUSOS, 1998).

Segundo Barton (2002), os estressores físicos e químicos podem causar respostas não específica em peixes, as quais são consideradas adaptativas, visando capacitar o animal a lidar com a perturbação e manter seu estado de homeostase. A resposta ao estresse é uma resposta integrada a ameaças externas originárias de fatores físicos, químicos ou biológicos. Os estressores induzem padrões típicos de ativação no cérebro e no sistema endócrino, levando a atividades cardíaca e respiratória aumentadas, seguida por estímulo da

mobilização energética (WENDELAAR BONGA, 2008).

As respostas fisiológicas ao estresse são agrupadas em primárias, que inclui mudanças endócrinas como as percebidas nos níveis de catecolaminas circulantes e corticosteróides; e secundárias, as quais incluem mudanças nas características metabólicas, no balanço hidromineral e nas funções cardiovasculares, respiratórias e imunes. As respostas terciárias compreendem mudanças no crescimento, resistência a doenças e no comportamento do animal, as quais podem resultar das respostas primárias e secundárias e podem afetar a sobrevivência dos peixes (BARTON, 2002).

É importante ressaltar que, independentemente do conceito de estresse utilizado, as respostas relacionadas ao estresse são, em geral, respostas adaptativas que auxiliam os animais a lidar com situações adversas. Por outro lado, a contínua exposição à estressores pode comprometer o funcionamento do organismo a longo prazo e, eventualmente, levar a mortalidade (HORI, 2005).

2.2. Ferramentas diagnósticas

Além dos estudos clássicos de poluição em corpos d'água baseados em análises físico-químicas, esforços tem sido feitos visando identificar e estruturar novas abordagens e ferramentas para diagnosticar a toxicidade no meio aquático. A análise de substâncias químicas em tecidos e fluidos corporais, metabólitos tóxicos, atividades enzimáticas e variáveis bioquímicas são frequentemente utilizadas na documentação da interação entre o poluente e os sistemas biológicos (TORRE et al. 2007). As mudanças observadas em biomarcadores são úteis para reconhecer a toxicidade do ambiente aquático em organismos não-alvo.

Os biomarcadores podem ser definidos como variações induzidas por xenobióticos em componentes ou processos celulares e bioquímicos, estruturas ou funções que são mensuráveis em um sistema biológico ou amostra (SHUGART et al. 1992); ou simplesmente como uma resposta biológica a um químico ambiental que fornece uma medida da exposição e também dos efeitos tóxicos (WALKER, 1995). Uma das principais áreas de ênfase na pesquisa de biomarcadores é a aplicação e validação de marcadores que salientem efeitos

tóxicos de poluentes aquáticos no meio ambiente (SCHWAIGER et al. 1997).

As respostas dos biomarcadores de efeito restringem-se aos menores níveis de complexidade biológica, como os níveis moleculares, celulares e teciduais. Assim, eles precedem alterações em níveis populacionais e, conseqüentemente, podem ser considerados sinais prematuros de alerta na análise da qualidade do meio ambiente (TORRE et al. 2007).

A avaliação de efeitos tóxicos de pesticidas em peixes é importante devido à posição de ligação na cadeia alimentar ocupada pelos peixes e também ao desequilíbrio do ambiente aquático causado pelos xenobióticos (ORUÇ e UTSA, 2007). Devido à sensibilidade desses animais a mudanças bióticas e abióticas em seu meio, o interesse em entender os mecanismos fisiológicos associados à resposta dos peixes ao estresse ambiental vem crescendo (SANCHO et al. 2009).

Os parâmetros hematológicos são úteis e sensíveis para o diagnóstico de doenças e monitoramento do status fisiológico de peixes expostos a agentes tóxicos (ZHANG et al. 2007). Vários autores mostraram que os parâmetros hematológicos podem disponibilizar informações satisfatórias acerca das respostas fisiológicas dos peixes frente aos estressores ambientais por duas razões principais: a associação entre o ambiente externo e o sistema circulatório dos peixes e a disponibilidade de acessar o sangue dos peixes (ELAHEE e BHAGWANT, 2007).

Atualmente, efeitos de exposição à xenobióticos, incluindo à inseticidas organofosforados, nos parâmetros hematológicos de peixes têm sido estudados (SINGH e SRIVASTAVA, 1994; KHATTAK e HAFEEZ, 1996; TAVARES et al. 1999; TAVARES-DIAS et al. 2002). Segundo Köprücü e colaboradores (2006), a exposição de *Silurus glanis* às doses de 1, 2, 4, 6, 8, 16, 32 e 64 mg L⁻¹ de diazinon resulta em valores significativamente baixos de eritrócitos, leucócitos, hemoglobina, hematócrito, MCV (volume corpuscular médio), MCH (hemoglobina corpuscular média) e MCHC (concentração de hemoglobina corpuscular média).

Os OP podem induzir o estresse oxidativo, com a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e alteração dos sistemas enzimáticos antioxidantes. Segundo Thomaz e colaboradores (2009), a exposição da tilápia do Nilo a 0,5 mg

L⁻¹ de triclorfon por 96 horas, pode induzir o estresse oxidativo no coração, com diminuição da atividade da enzima glutathione S-transferase e elevação de hidroperóxidos.

O efeito primário de um OP tanto em organismos invertebrados como em vertebrados, incluindo os humanos, é a inibição da acetilcolinesterase (AChE). Devido a esse fato, a atividade das colinesterases é amplamente utilizada como um biomarcador da exposição à OP. A inibição da AChE é o resultado de uma reação química entre a enzima e o OP. A enzima fosforilada não é mais capaz de efetuar a hidrólise da acetilcolina (FUKUTO, 1990), provocando acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica. Tal acúmulo provoca a interrupção da função nervosa, o que pode culminar na morte do organismo (VARÒ et al. 2003).

Há extensos relatos na literatura referindo-se aos efeitos da exposição de peixes à organofosforados, no que concerne à atividade da AChE. A carpa comum (*Cyprinus carpio*), exposta a 0,25 e 0,50 mg L⁻¹ de triclorfon por 1 e 24 horas, apresenta redução de 55-57% da atividade da AChE cerebral (CHANDRASEKARA e PATHIRATNE, 2005). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta a 0,25 mg L⁻¹ de triclorfon por 96 horas apresenta redução de 85% da atividade da AChE muscular (GUIMARÃES et al. 2007). Feng e colaboradores (2007) verificaram que o triclorfon, quando incubado com homogeneizado de fígado e músculo de *Tilapia nilotica* por 0, 30, 60 e 90 minutos nas concentrações de 0,0001; 0,001; 0,1 e 1 g L⁻¹ causa inibição significativa da AChE, sendo que essa inibição é tempo e concentração-dependente.

Além dos efeitos nas fibras musculares e na transmissão do impulso nervoso, a inibição da AChE pode reduzir as respostas do sistema olfativo dos peixes, o qual é de extrema importância na sobrevivência dos animais (TIERNEY et al. 2010). De acordo com estes autores, a produção do muco do epitélio olfativo é regulada pela secreção de acetilcolina. Com a redução da hidrólise pela AChE, a produção de muco irá aumentar, aumentando assim a distância em que os aromatizantes dissolvidos terão que se difundir para ter contato com as proteínas receptoras nos cílios e outras extensões apicais dos nervos sensíveis olfativos.

Os OP podem exercer, ainda, outro efeito tóxico no sistema nervoso central

e periférico, chamado “neuropatia tardia induzida por organofosforados”. Esse efeito é relacionado à fosforilação e posterior modificação (“envelhecimento”) de uma esterase do sistema nervoso, chamada esterase alvo da neuropatia. Os sintomas dessa neuropatia aparecem entre 14 e 24 dias após a intoxicação (SOGORB e VILANOVA, 2002).

Outras enzimas podem ser indicativas da toxicidade de xenobióticos, inclusive organofosforados. A alanina aminotransferase (ALAT) e a aspartato aminotransferase (ASAT) são enzimas indicadoras de hepatotoxicidade. Aumento nos valores destas enzimas sugere dano tecidual em fígado, rim e brânquias (OLUAH, 1999). A atividade da glutamato desidrogenase (GDH), particularmente no fígado, permite avaliar o metabolismo de aminoácidos e as inter-relações entre as vias metabólicas de proteínas e carboidratos (AGUIAR et al. 2004). A atividade elevada de lactato desidrogenase (LDH) sugere danos teciduais em peixes e é boa ferramenta diagnóstica em toxicologia (RAO, 2006a). O matrinxã (*Brycon cephalus*) exposto ao paration metílico por 96 horas apresenta inibições significativas na atividade da AChE plasmática e cerebral (64% e 87%, respectivamente). A análise da ALAT e da GDH indica dano ao fígado e prejuízo ao metabolismo de aminoácidos (AGUIAR et al. 2004).

Tilápia (*Oreochromis mossambicus*) exposta a uma concentração sub-letal do RPR-II [2-butenóico 3-(dietoxifosfínioil) metil éster] apresenta redução de 67%, 77% e 73% da atividade da AChE no cérebro, brânquias e músculo, respectivamente, após 30 dias de exposição (RAO, 2006a). Além disso, ocorre aumento na atividade da fosfatase ácida (FAC) e fosfatase alcalina (FAL) no plasma, brânquias e rins, enquanto que no fígado ocorre redução. Os peixes apresentam recuperação significativa destes parâmetros após sete dias de recuperação.

Os biomarcadores bioquímicos apresentam um potencial considerável em mensurar os efeitos dos químicos em condições de campo, especialmente quando combinações desses biomarcadores são cuidadosamente escolhidas para esse fim (WALKER, 1995). De acordo com este autor, as respostas dos biomarcadores bioquímicos podem ser alertas precoces dos efeitos ambientais de químicos,

antes que ocorra efeitos sérios em indivíduos ou populações.

Os xenobióticos no ambiente aquático podem induzir modificações patológicas em peixes. Como um indicador de exposição a contaminantes, a histologia representa um instrumento útil para a avaliação do grau de poluição (Cengiz, 2006). Segundo Johnson e colaboradores (1993), a análise histológica é um método rápido para se determinar os efeitos dos agentes químicos em tecidos e órgãos, pois ocorrem alterações na morfologia em resposta ao estresse sub-letal ou crônico.

As brânquias e a pele são os órgãos dos peixes primariamente atingidos e afetados pelos agentes químicos. Estes órgãos exibem grande superfície de contato e ambos apresentam células de muco, que possuem papel importante na resistência a patógenos e substâncias tóxicas (SHEPHARD, 1994). Após a absorção nas brânquias e na pele, os agentes químicos atingem o fígado, que tem papel fundamental no seu metabolismo; e os rins, que atuam na manutenção da estabilidade interna e na excreção (JOBBLING e SUMPTER, 1993).

Os estressores ambientais aumentam a permeabilidade da superfície epitelial das brânquias para a água e os íons, induzindo assim distúrbios hidrominerais sistêmicos (WENDELAAR BONGA, 1997). De acordo com Fanta e colaboradores (2003), as brânquias de *Corydoras paleatus* exposto a 0,58 $\mu\text{L L}^{-1}$ do paration metílico apresentam hiperplasia epitelial, edema e destacamento. O fígado exibe estagnação biliar, necrose focal, atrofia e vacuolização.

O tecido renal de *Prochilodus lineatus* exposto a 0,2 $\mu\text{L L}^{-1}$ de triclorfon na formulação Dipterex 500[®] apresenta aumento do espaço inter-capsular com atrofia glomerular, hipertrofia das células do túbulo renal, com pequenos grânulos no citoplasma e pouca alteração nuclear após 24 horas de exposição (VEIGA et al. 2002). O fígado de jundiá (*Rhamdia quelen*) exposto a 0,01 mL L^{-1} de paration metílico exibe perda de contorno celular, núcleo picnótico e descaracterização do endotélio e do retículo endoplasmático rugoso após 4 horas de exposição, sendo que após 48 e 72 horas ocorrem focos de necrose (MELO et al. 2008).

A correlação de resultados obtidos em níveis biológicos diferentes, como níveis molecular (metabolismo de biotransformação), subcelular (expressão

genotóxica) e celular/tecidual (efeitos histopatológicos) podem levar a uma melhora substancial no conhecimento de respostas integradas da intoxicação de peixes (PACHECO e SANTOS, 2002).

2.3. Triclorfon

Historicamente, postula-se que os pesticidas organofosforados (OP) surgiram na década de 40, mas os principais representantes desta classe foram introduzidos nas décadas de 60 e 80. Mesmo com a implantação de outras classes de pesticidas e de novas metodologias no controle de pragas, 40% do mercado mundial de pesticidas em 1999 era representado por organofosforados (SANTOS et al. 2007).

Durante as últimas décadas, quantidades significativas de pesticidas pertencentes à classe dos OP têm sido liberadas no meio ambiente. Os pesticidas OP foram desenvolvidos por manipulação química de gases que atuam no sistema nervoso e modificações adicionais resultaram em químicos com alta seletividade de espécies (AYDIN e KÖPRÜCÜ, 2005).

Existem diferentes classes e tipos de organofosforados, mas todos eles possuem em comum um átomo de fósforo e uma ligação característica fosforil (P=O) ou tiofosforil (P=S). Alguns OP possuem atividade anticolinesterásica, enquanto outros não apresentam tal atividade e precisam ser dessulfurados até o oxon análogo para adquirir a atividade de inibição enzimática (DE BLEECKER, 2008).

O triclorfon [dimetil (2,2,2 – tricloro- 1 hidroxietil) fosfonato] (Figura 1) é um inseticida organofosforado utilizado para controlar uma grande variedade de artrópodes, e seu modo de ação se dá pela inibição da acetilcolinesterase. No Brasil, esse inseticida é classificado como altamente tóxico (classe toxicológica II) e perigoso para o ambiente (classe ambiental III) (SIA, 2003).

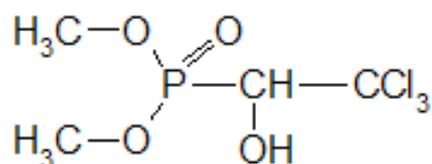


Figura 1. Fórmula estrutural do triclorfon.

O triclorfon é um composto sólido cristalino, solúvel em água, diclorometano, tolueno e 2-propanol (LOPES et al. 2006). Segundo Tomlin (2000), em meio alcalino (pH 8) e 37,5 °C, o triclorfon é hidrolisado a diclorvos. Essa hidrólise ocorre rapidamente, sendo que após 96 horas em água, apenas 0,7% da concentração inicial de triclorfon permanece (YOSHIMURA e ENDOH, 2005). O diclorvos é mais tóxico que o triclorfon e apresenta riscos aos organismos não-alvo, como peixes, caranguejos e camarões.

Kubitza e Kubitza (1998) indicam a utilização de triclorfon na piscicultura visando o combate à parasitas. Devido ao elevado estresse que os peixes cultivados em sistemas intensivos são submetidos, esses animais tornam-se mais susceptíveis a parasitas e patógenos, o que favorece o estabelecimento de doenças e conseqüentes perdas na piscicultura.

A concentração de 0,1 mg/L de triclorfon na água resulta em uma concentração de 0,0410 mg kg⁻¹ no músculo branco *P. mesopotamicus*, sendo necessário um período de 50 dias para a eliminação de 95% do triclorfon dos tecidos do peixe (LOPES et al. 2006).

Segundo a resolução CONAMA n.20 (BRASIL, 1986), a concentração limite de organofosforados em águas de classe I (destinadas à criação natural ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana) é de 0,01 mgL⁻¹. A resolução CONAMA n. 357 (BRASIL, 2005) não dispõe sobre organofosforados em geral, apenas sobre os inseticidas OP malation e paration, cujas concentrações permitidas são 0,1 µgL⁻¹ e 0,04 µgL⁻¹, respectivamente, em águas de classe II (destinadas à aqüicultura e à atividade de pesca).

2.4. Biotransformação

Os peixes respondem aos poluentes ambientais pela alteração de suas funções metabólicas ou adaptação das mesmas. Dentre os biomarcadores adotados em análises ecotoxicológicas, há um notável interesse nos parâmetros relacionados à desintoxicação enzimática de xenobióticos e ativação dos mesmos, processo conhecido como biotransformação (PACHECO e SANTOS, 2002).

Se um xenobiótico é absorvido, a distribuição pode ocorrer para órgãos alvo específicos onde o xenobiótico não modificado causa um efeito biológico direto (Figura 2). O químico pode também ser armazenado em locais com alta concentração de lipídeos, onde pode ser mobilizado pela utilização lípidica do animal. Alguns compostos podem ser diretamente excretados sem interação com os órgãos alvo. No entanto, como a maioria dos compostos absorvidos por peixes tende a ser lipofílica, muitos são biotransformados a compostos mais hidrofílicos, visando aumentar a polaridade dos mesmos e subsequente eliminação (SCHLENK, 2002). Assim, a biotransformação reduz a meia-vida do xenobiótico e minimiza o seu potencial tóxico. Por outro lado, muitos xenobióticos são tóxicos em razão de seus metabólitos. A biotransformação que gera subprodutos mais tóxicos é chamada de toxificação ou ativação metabólica.

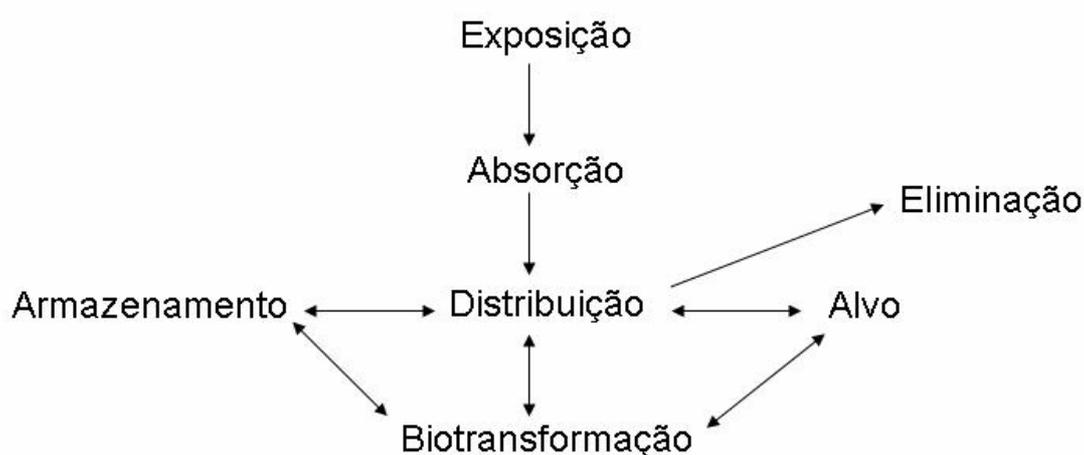


Figura 2. Esquema de disposição de substâncias químicas em organismos vivos (Adaptado de SCHLENK, 2002).

As reações de biotransformação de xenobióticos são divididas em reações de fase I e reações de fase II. Nas reações de fase I, um grupo polar como hidroxila (-OH), carboxila (-COOH), tiol (-SH) ou amino (-NH₂) é introduzido na molécula por reações de oxidação, redução e hidrólise. A alteração da molécula pode também expor um desses grupos. Os metabólitos formados a partir dessas reações podem ser mais tóxicos que o composto parental, mas pode ser que metabólitos atóxicos sejam formados. Nas reações de fase II, os metabólitos polares são conjugados com substratos endógenos como os glicuronídeos, sulfatos, acetatos e aminoácidos, os quais formam compostos hidrossolúveis que podem ser excretados (JOKANOVIĆ, 2001).

A maioria dos organofosforados (OP) em seu estado não metabolizado não apresenta grande potencial de inibição da AChE. Entretanto, no organismo, seu potencial anticolinesterásico pode ser aumentado, e os efeitos tóxicos resultantes das reações de biotransformação representam a soma dos processos bioquímicos de ativação e de desintoxicação. A desintoxicação de organofosforados inclui sua biotransformação em metabólitos não-tóxicos (JOKANOVIĆ, 2001).

Os OP são desintoxicados principalmente por reações de oxidação e hidrólise (fase I). Os dois grupos principais de enzimas envolvidos na hidrólise desses compostos são as fosfotriesterases e as carboxiesterases (SOGORB e VILANOVA, 2002). De acordo com estes autores, as fosfotriesterases quebram a ligação entre o átomo de fósforo e o grupo liberado. Os produtos da hidrólise são mais polares que o OP primário, não acumulam nos tecidos gordurosos e podem ser facilmente eliminados pela excreção nitrogenada, além de apresentarem menor poder fosforilante e serem, portanto, menos tóxicos. Devido a esses fatos, a hidrólise pelas fosfotriesterases é considerada uma reação de desintoxicação.

No caso dos organofosforados, é aceitável a divisão das reações de biotransformação em processos de ativação e de desintoxicação (JOKANOVIĆ, 2001). A ativação ocorre visando dessulfurar a ligação P=S, tornando-a P=O. O triclorfon não necessita desta reação de ativação, visto que o fósforo está diretamente ligado ao oxigênio. No entanto, sua hidrólise resulta em diclorvos, o qual é mais tóxico que o produto primário.

A biotransformação desempenha um importante papel em diferentes espécies no que diz respeito à susceptibilidade das mesmas, sendo que muitas espécies são capazes de se desintoxicarem, enquanto outras tendem a bioativar compostos levando-os a intermediários mais reativos e mais tóxicos (SCHLENK, 2002).

2.5. *Piaractus mesopotamicus*

O Brasil é um país que apresenta uma riqueza incomparável de espécies de peixe, condizente com sua dimensão continental. São encontradas espécies das mais variadas formas e tamanhos, muitas aptas à piscicultura tanto para produção de peixe-alimento ou ornamental quanto para pesca esportiva (CRESCÊNCIO, 2005).

Dentre as espécies presentes no Brasil, está o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). O pacu é representante das superordem Ostariophysi, na qual se incluem os peixes de maior valor comercial na pesca e na piscicultura brasileiras. A ordem Characiformes é um grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul e amplamente distribuído na região neotropical. Dentre todas as famílias, a família Characidae apresenta o maior número de espécies descritas dentro da ordem e é a mais completa (URBINATI e GONÇALVES, 2005).

O pacu é um peixe de escamas, cujo corpo é rombóide e achatado lateralmente, e possui coloração uniforme, a qual varia do castanho ao cinza escuro, com o ventre amarelado (BRITSKI, 1970) (Figura 3). É um peixe onívoro, que se alimenta principalmente de folhas, caules, flores, frutos e sementes. Havendo necessidade e oportunidade, ele se alimenta de insetos, aracnídeos, moluscos e peixes. No ambiente natural, o pacu não tem comportamento alimentar contínuo e seu ciclo de vida está estritamente relacionado a períodos de alta ingestão de carboidratos. Sua alimentação sofre flutuações de acordo com a disponibilidade do alimento, em consequência de variações ambientais e da imigração reprodutiva (URBINATI e GONÇALVES, 2005).



Figura 3. Exemplar de *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887).

Segundo o IBAMA (2007), a aquicultura continental representa 17,8% da produção nacional de pescados no Brasil. No ano de 2005, a produção nacional de pacu a partir de pesca extrativista continental foi de 10.858 toneladas e, a partir de aquicultura continental, a produção nacional foi de 9.044 toneladas. O pacu é uma das mais importantes espécies de cultivo das regiões centro-oeste e sudeste. O crescimento da piscicultura brasileira é constante e irreversível, sendo que de 1992 a 2005 a produção teve um aumento de 650% (CRESCÊNCIO, 2005).

Além de sua importância no cenário da aquicultura nacional, o pacu é hospedeiro natural de diversas espécies de parasitas. Em pacus cultivados, é relatada a presença de parasitas monogenóides (*Anacanthorus penilabiatus* e *A. spathulatus*, *Urocleidoides* sp.), protozoários (*Trichodina* sp., *Ichthyophthirius multifiliis* e *Piscinoodinium pillulare*), crustáceos (copepoditos e adultos de *Laernea cyprinacea*, *Argulus* sp., *Dolops carvalhoi* e *Ergasilus* sp.) e mixosporídeos (*Henneguya* sp. e *Myxobolus colossomatis*) (URBINATI e GONÇALVES, 2005).

Visto a importância econômica do pacu e as perdas acarretadas por infestações de parasitos em pisciculturas, justifica-se a escolha deste caraciforme para a realização deste trabalho.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos metabólicos da exposição de pacu (*P. mesopotamicus*) ao inseticida organofosforado triclorfon, seguida de recuperação em água livre do xenobiótico. Para isso, a seguinte estratégia experimental foi empregada:

- 1) Determinação da toxicidade aguda do triclorfon para alevinos e jovens de pacu (*P. mesopotamicus*);
- 2) Avaliação dos efeitos histopatológicos em brânquia, fígado, rim e pele em alevinos submetidos à exposição aguda;
- 3) Avaliação das respostas metabólicas de *P. mesopotamicus* submetidos à exposição sub-letal (10% da CL 50-96h) de triclorfon por 96 horas;
- 4) Avaliação das respostas metabólicas e neurotoxicidade de *P. mesopotamicus* após sete e 14 dias de recuperação à exposição sub-letal (10% da CL 50-96h) de triclorfon por 96 horas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal devido à disponibilidade de salas de bioensaio para a realização dos testes de toxicidade aguda e um setor de mesocosmos com possibilidade de simulação de condições ambientais.

O produto utilizado foi o triclorfon [dimetil (2,2,2 – tricloro- 1 hidroxietil) fosfonato] na formulação Masoten[®] (Bayer do Brasil S.A.), contendo 80 gramas de triclorfon/100g de produto comercial. Os procedimentos histológicos foram realizados no Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. As análises das variáveis bioquímicas foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica Adaptativa da Universidade Federal de São Carlos.

4.1. Teste de toxicidade aguda (CL50;96h) do triclorfon para alevinos e jovens de pacu

Os exemplares de pacu (*P. mesopotamicus*), provenientes do setor de cultivo de organismos aquáticos do NEPEAM, foram mantidos por 30 dias em tanques de 400 litros, com renovação de água contínua, sendo alimentados com ração comercial até a saciedade. Após este período, os peixes foram transferidos para tanques de 250 litros para aclimação em sala de bioensaio, por dez dias (ABNT, 2006). Nos bioensaios foram utilizados alevinos com peso médio de $2,49 \pm 0,42$ g e jovens com peso médio de $41,90 \pm 5,18$ g.

Para avaliação da sensibilidade e da sanidade dos animais foram realizados inicial e periodicamente testes com cloreto de potássio (KCl) G.A. 99,9% (ABNT, 2006), sendo que a (CL (I)50;96h) do KCl para alevinos de pacu foi de $1,86 \pm 0,33$ mgL⁻¹. Em seguida, foi realizado um teste preliminar de toxicidade aguda para determinação do intervalo de concentração de triclorfon que resultaria em zero e 100% de mortalidade. Tais intervalos foram utilizados nos testes definitivos.

Para a determinação da concentração letal 50%, três exemplares de

alevinos de pacu foram distribuídos em aquários com três litros de água de diluição e um exemplar jovem foi distribuído em cada aquário com oito litros de água de diluição. A densidade utilizada foi de 0,83 g/L para os alevinos e de 5,23 g/L para os peixes jovens. Os alevinos foram expostos a cinco concentrações de triclorfon (0,01; 0,03; 0,05; 0,07; e 0,1 mgL⁻¹) e os jovens, a quatro concentrações (0,03; 0,05; 0,07; e 0,1 mgL⁻¹), ambos com três réplicas e um controle (ABNT, 2006), em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Os testes definitivos foram conduzidos em sistema estático, sem substituição, sifonagem de água ou alimentação durante o período de exposição (OECD, 1992). Os parâmetros de qualidade de água permaneceram constantes durante o período experimental: temperatura de 26,9 ± 0,07 °C; oxigênio dissolvido de 9,13 ± 1,87 mg/L, pH de 7,03 ± 0,2 e condutividade elétrica de 0,183 µS/cm (ABNT, 2006). A mortalidade foi avaliada diariamente, e feita a retirada dos animais mortos; os valores de (CL (I)50;96h) foram estimados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al. 1977).

4.2. Avaliação histológica

Após o teste de toxicidade aguda do triclorfon para os alevinos de pacu, foi realizada a análise histológica de brânquias, fígado, rim e pele. Os órgãos foram retirados e imersos em solução fixadora de formaldeído a 10% tamponado (0,1M; pH 7,3), por 24 horas. Após a fixação, foi realizada a desidratação em série crescente de álcool (70 a 100 %), diafanização em xilol e embebição em parafina plástica Histosec[®] (Merck). Em seguida, foi realizada a microtomia em micrótomo automático (Leica[®], RM-2155) obtendo-se cortes de 3 a 5µm de espessura. As secções histológicas foram coradas com hematoxilina/eosina e reação de PAS (ácido periódico de Schiff) (BEHMER et al. 1976). Após este procedimento, foi realizada a foto-documentação em foto microscópio Leica[®].

4.3. Exposição sub-letal ao triclorfon e recuperação

Para a realização do experimento de exposição sub-letal e recuperação de peixes jovens, foi utilizado 10% da (CL (I)50;96h) obtida no teste de toxicidade

aguda, corrigida para o peso mediano de 55 gramas. Neste experimento, oito peixes jovens com peso médio de $60,76 \pm 1,58$ g foram distribuídos em 18 tanques com capacidade para 400 litros. A concentração utilizada foi de 0,0084 mg/L de triclorfon, a qual foi adicionada em nove tanques que ficaram expostos ao produto por 96 horas, em sistema estático, sem substituição ou sifonagem da água. Durante o período experimental, os tanques foram mantidos com aeração artificial constante, através de um sistema de soprador de ar.

O desenho experimental utilizado obedeceu a delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo nove tanques utilizados como controle (sem adição do triclorfon) e nove utilizados para a exposição e recuperação: três tanques como controle da exposição de 96 horas; três tanques de exposição de 96 horas; três tanques como controle da recuperação de sete dias; três tanques como recuperação de sete dias; três tanques como controle da recuperação de quatorze dias e três tanques como recuperação de quatorze dias. Nos tratamentos de recuperação de sete e 14 dias, após a exposição de 96 horas, o fluxo de água foi aberto com taxa de renovação da água de 0,27 mL/minuto. Após 96 horas de exposição, sete e 14 dias de recuperação, cinco peixes de cada tanque foram coletados para a obtenção de sangue, fígado, músculo branco e cérebro, utilizados nos ensaios bioquímicos.

Temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade da água foram determinados por sonda Dissolved Oxygen YSI 556. A dureza da água foi determinada segundo APHA (1980); a alcalinidade segundo GOLDSTEIN e CLYMO (1969) e a amônia pelo método modificado de GENTZKOW e MASEN (1942).

4.4. Determinação dos parâmetros hematológicos

O sangue utilizado nas análises foi coletado com seringas heparinizadas, aliquotado para análise dos parâmetros hematológicos e centrifugado a $12000 \times g$ por três minutos para obtenção do plasma.

4.4.1. Hematócrito

O hematócrito foi determinado através da utilização de micro-capilares, que

depois de preenchidos com amostra de sangue foram vedados com massa de modelar e centrifugados a 12000 x *g* por três minutos. Um cartão de leitura de hematócrito foi utilizado para a determinação do seu valor, em porcentagem.

4.4.2. Hemoglobina total

A hemoglobina total foi determinada segundo Drabkin (1948). Para tanto, em 10 µL de sangue da amostra foram adicionados 2 mL de solução Drabkin (KCN, KH₂PO₄, K₃[Fe(CN)₆]. A densidade óptica foi medida em 540 nm, contra um branco contendo apenas solução de Drabkin. Para determinação dos valores de hemoglobina total foi utilizada a seguinte expressão:

$$Hb \text{ total (gHb/dL)} = \text{densidade óptica} \times 1,6114 / 11 \times \text{diluição}$$

4.4.3. Contagem de eritrócitos (RBC)

Para a contagem de eritrócitos foram utilizados 10 µL de sangue da amostra em 2 mL de solução de citrato formol, e transferido volume adequado para câmara de Neubauer. Os eritrócitos foram contados em cinco grupos de quadrados, que são subdivididos em 16 quadrados menores, totalizando assim, 80 quadrados menores. Os valores foram obtidos através da soma dos cinco quadrados maiores com 0,1 mm³; os valores foram convertidos para milhões por mm³, levando em conta a diluição (LIMA, 1969).

4.4.4. Volume corpuscular médio (VCM)

O cálculo do volume corpuscular médio foi feito através da seguinte expressão:

$$VCM (\mu\text{mm}^3) = [\text{hematócrito (\%)} / \text{RBC (milhões/mm}^3)] \times 10$$

4.4.5. Hemoglobina corpuscular média (HCM)

O cálculo da hemoglobina corpuscular média foi feito através da seguinte expressão:

$$HCM (\text{pg/célula}) = [\text{Hb total (g\%)} / \text{RBC (milhões/mm}^3)] \times 10$$

4.4.6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

O cálculo da concentração de hemoglobina corpuscular média foi feito através da seguinte expressão:

$$\text{CHCM (\%)} = [\text{Hb total (g\%)} / \text{Hematócrito (\%)}] \times 100$$

4.5. Quantificação de intermediários metabólicos em tecido e plasma sanguíneo

As concentrações de ácidos graxos livres, amônia, aminoácidos livres, glicose, lactato, piruvato, proteína e triacilgliceróis foram determinadas em extrato celular obtido tal como descrito a seguir.

O fígado e o músculo branco foram homogeneizados em 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% ou água destilada (homogeneizado neutro) utilizando um homogeneizador IKA® T10 Basic Ultra-Turrax a 1.000 rpm por um minuto em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado por três minutos a 12000 x *g* e o sobrenadante foi utilizado para as determinações dos intermediários metabólicos. Nas determinações plasmáticas foram utilizados 100 µL de plasma em 1 mL de TCA 20%, ou o plasma total.

4.5.1. Ácidos graxos livres

As concentrações de ácidos graxos livres foram determinadas segundo MILAN (1965). Em um volume apropriado de amostra, homogeneizada em água, foi adicionado 2 mL de solução extratora DOLE (heptano, álcool isopropílico e H₂SO₄ 1N na proporção de 1: 4: 0,1) e agitada em vortex, por 20 segundos. Foram adicionados a essa mistura 1 mL de heptano e 2 mL de água destilada. Depois de agitar por inversão lentamente, os tubos foram centrifugados a 3000 x *g* por 3 minutos. Seiscentos microlitros do sobrenadante foram retirados e transferidos para outro tubo. Nesse sobrenadante foram adicionados 800 µL de heptano/clorofórmio (1:6) e 1 mL de reagente cobalto. A mistura foi agitada em vórtex por 30 segundos e centrifugada a 3000 x *g* por três minutos. Seiscentos micro-litros do sobrenadante foram retirados e transferidos para outro tubo, onde receberam mais 600 µL de indicador (solução estoque 0,4% de α-nitroso-β-naftol em etanol 96°). Após 15 minutos, foi realizada leitura óptica em 500 nm. A solução padrão de ácidos graxos consiste de 4 mM de palmitato.

4.5.2. Amônia

A concentração de amônia foi determinada em uma alíquota do extrato de TCA 20%, onde foram adicionados água destilada, para um volume final de 2 mL,

e 0,5 mL de reativo de Nessler (GENTZKOW e MASEN 1942). A leitura óptica foi feita em 420 nm contra um padrão de amônia.

4.5.3. Aminoácidos livres

As concentrações de aminoácidos livres foram determinadas segundo COPLEY (1941). Em uma alíquota de extrato aquoso foram adicionados 2 mL de nihidrina 0,1% (em álcool isopropílico) e incubado por 40 minutos a 40 °C. Os tubos foram centrifugados por dois minutos a 3000 x *g* e a leitura ótica realizada em 570 nm contra padrão de glicina.

4.5.4. Glicose

Para a determinação das concentrações de glicose foi utilizado o Kit LabTest[®]. Uma alíquota de amostra, homogeneizada em água, mais reagente do Kit foram pipetados em uma micro-placa, incubados a 37°C por 10 minutos, e realizada a leitura óptica em 525 nm contra um padrão de glicose.

4.5.5. Lactato

A concentração de lactato foi quantificada segundo HARROWER e BROWN (1972). A uma alíquota da amostra, homogeneizada em TCA 20%, foi adicionado CuSO_4 a 4% e H_2SO_4 PA. Após agitação e incubação a 100°C por cinco minutos, foram adicionados 80 μL de p-fenilfenol e a mistura foi incubada a 100°C por 90 segundos. A leitura ótica foi realizada a 570 nm, contra um padrão de lactato.

4.5.6. Piruvato

O piruvato foi determinado segundo Lu (1939), em homogeneizado com TCA 20%. Em um volume de amostra foi adicionado dinitrofenilhidrazina 0,1% (em HCl 2N) e incubado a 37 °C por 30 minutos. À mistura foi adicionado 3 mL de NaOH 1,3N e feita a leitura óptica a 440 nm contra um padrão de piruvato.

4.5.7. Proteína

O teor de proteína foi estimado de acordo com o método descrito por

KRUGER (1994), que utiliza o reagente de Bradford. Após diluições apropriadas para cada tecido, 10 μL de cada amostra e 190 μL do reagente foram colocados em duplicata em uma micro-placa. Após incubação à temperatura ambiente, no escuro por 5 a 10 minutos, a leitura óptica foi realizada a 620 nm contra um padrão de albumina.

4.5.8. Triacilgliceróis

Para a determinação da concentração de triacilgliceróis, foi utilizado o Kit Liquiform[®]. Em uma amostra, homogeneizada em água, foi adicionado o reativo em microplate e incubado a 37 °C por 10 minutos. A leitura óptica foi realizada a 525 nm contra um padrão de triacilgliceróis.

4.6. Glicogênio

Para a determinação dos estoques de glicogênio foi utilizado o método descrito por BIDINOTTO e colaboradores (1997). Porções de tecido (músculo branco ou fígado) foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados de KOH 6N. Posteriormente, os tubos foram incubados a 100 °C por 5 minutos até dissolução. Dessa mistura, 250 μL foram transferidos para outro tubo, e adicionados de 3 mL de etanol PA e 100 μL de K_2SO_4 . O precipitado foi centrifugado e o sobrenadante, descartado por inversão do tubo. O precipitado foi re-suspendido e adicionado de 2,5 mL de água destilada. Na dissolução foi determinado o teor de açúcares redutores totais pelo método de Dubois e colaboradores (1956). A concentração de glicogênio é expressa em μmols de glicosil-glicose/ g de tecido.

4.7. Determinações enzimáticas

Os tecidos foram homogeneizados em tampão de homogeneização (fosfato 10mM/TRIS 20mM pH 7.0 em glicerina 50%) na proporção de 50 mg de tecido/ mL de tampão, em banho de gelo. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 5000 x g por três minutos a 4 °C e o sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado como fonte enzimática. O plasma foi utilizado integralmente nas

determinações enzimáticas.

4.7.1. Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade de AChE muscular e cerebral foi determinada de acordo com o método modificado de Ellman e colaboradores (1961). A mistura de reação consistiu de: acetiltiocolina 3,73 mM e 5,5' -dithiobis-2-nitrobenzoico ácido (DTNB) 6,4 mM, como cromogênio (diluído com 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5). As amostras de cérebro e de músculo branco foram homogeneizadas em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 em 50% de glicerina (v/v) e centrifugadas a 21000 x g a 4 °C por três minutos, sendo que o sobrenadante foi usado como fonte de enzimas. A atividade enzimática foi lida em 412 nm por um minuto para o cérebro e dois minutos para o músculo, a 25 °C, e expressa em unidades de acetilcolina hidrolisada por miligrama de proteína. O coeficiente de extinção molar ($\zeta_{412} = 16,950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizado foi previamente determinado. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária pra transformar 1 μmol de substrato por minuto.

4.7.2. Alanina aminotransferase (ALAT)

A atividade da alanina aminotranferase foi mensurada por cinética nos homogeneizados de músculo branco e fígado (Bergmeyer et al., 1978). A reação é baseada na transaminação da alanina 500mM e α -cetogluturato 200mM em piruvato, em tampão tris (100 mM; pH 7,5). O piruvato é reduzido a lactato pela lactato desidrogenase (LDH) exógena (0,1 UI) pela extinção do NADH^+H^+ em comprimento de onda de 340 nm. A atividade da ALAT é expressa em UI mg proteína. Uma unidade enzimática (UI) foi definida como um μmol de NADH hidrolizado por minuto. O coeficiente de extinção molar ($\zeta_{340} = 0,85510 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizado foi previamente determinado.

4.7.3. Aspartato aminotransferase (ASAT)

A atividade da ASAT foi medida por cinética em homogeneizados de

músculo branco e fígado (Bergmeyer et al., 1978). A reação é baseada na transaminação do aspartato 220mM e α -cetoglutarato 200mM em oxalacetato, em tampão tris (80mM; pH 7,8). O oxalacetato é reduzido a malato pela MDH (malato desidrogenase) exógena (0,1 UI) pela extinção do NADH^+H^+ em comprimento de onda de 340 nm. A atividade da ALAT é expressa em UI mg proteína. Uma unidade enzimática (UI) foi definida como um μmol de NADH hidrolisado por minuto. O coeficiente de extinção molar ($\zeta_{340} = 0,85510 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizado foi previamente determinado.

4.7.4. Fosfatase ácida (FAC)

A atividade da fosfatase ácida foi determinada pelo método de MOSS citado por BERGMEYER e BEACH (1983) modificado. A uma alíquota de homogeneizado celular foram adicionados 100 μL de p-nitrofenilfosfato (0,12M) para um volume final de 2,7 mL de tampão citrato de sódio pH 5.0 (0,05M). Após incubação a 30 °C por um tempo suficiente para cada tecido, a reação foi bloqueada pela adição de 400 μL de NaOH (2.0 N) e os tubos foram centrifugados a 5000 x g por três minutos. O sobrenadante foi lido em 405 nm contra um branco de reação e o produto de reação foi quantificado pelo coeficiente de extinção molar ($\zeta_{405} = 18,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) previamente determinado. A atividade enzimática é expressa em ηmol de p-nitrofenolato/ min/ mg de proteína.

4.7.5. Fosfatase alcalina (FAL)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada pelo método de BRETAUDIÈRE e SPILMAN citado por BERGMEYER e BEACH (1983) modificado. A uma alíquota de homogeneizado celular foi adicionado 100 μL de p-nitrofenilfosfato (0,12M) em uma mistura contendo 2,7 mL de tampão glicina pH 8,5 (0,05M) e MgCl_2 (0,01M). Após incubação a 30 °C por tempo suficiente para cada tecido, a reação foi interrompida pela adição de 400 μL de NaOH (2.0 N) e os tubos foram centrifugados a 5000 x g por três minutos. O sobrenadante foi lido em 405nm contra um branco de reação e o produto de reação foi quantificado pelo coeficiente de extinção molar ($\zeta_{405} = 18,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) previamente determinado. A

atividade enzimática é expressa em ηmol de p-nitrofenolato/ min/ mg de proteína.

4.7.6. Proteína no homogeneizado de tecidos

A proteína total foi determinada nos homogeneizados utilizados nas determinações enzimáticas. O teor de proteína foi estimado de acordo com o método descrito por KRUGER (1994), que utiliza o reagente de Bradford. Após diluições apropriadas para cada tecido, 10 μL de cada amostra e 190 μL do reagente foram colocados em duplicata em uma micro-placa. Após incubação à temperatura ambiente, no escuro por 5 a 10 minutos, a leitura óptica foi realizada a 620 ηm contra um padrão de albumina.

4.8. Análise estatística

Os valores obtidos dos parâmetros: concentração de intermediários metabólicos, atividades enzimáticas e índices hematológicos foram avaliados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre as médias obtidas dos parâmetros estudados foram comparadas por um teste paramétrico (teste t de *Student*) com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) para os grupos controle *versus* exposição sub-letal; controle *versus* recuperação de sete dias; e controle *versus* recuperação de 14 dias. As variáveis estão expressas em média \pm desvio padrão para 15 indivíduos ($n=15$).

5. RESULTADOS

5.1. Teste de toxicidade aguda do triclorfon para alevino e jovem de pacu

A (CL (I)50;96h) estimada para alevinos de pacu foi de $0,04 \text{ mgL}^{-1}$ de triclorfon, com limite inferior de $0,04 \text{ mgL}^{-1}$ e limite superior de $0,05 \text{ mgL}^{-1}$. A equação que representa a relação concentração-resposta é: $y = 22,54x - 32,59$, com R^2 de 0,91 (Figura 4).

Após 96 horas de exposição não ocorreu mortalidade no controle. Em $0,01$ e $0,03 \text{ mgL}^{-1}$ ocorreu 11,11% de mortalidade; em $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ a mortalidade foi de 66,67%; em $0,07 \text{ mgL}^{-1}$, de 88,89%; e em $0,1 \text{ mgL}^{-1}$, de 100%.

A (CL (I)50;96h) estimada para jovens de pacu foi de $0,07 \text{ mgL}^{-1}$ de triclorfon, com limite inferior de $0,06 \text{ mgL}^{-1}$ e limite superior de $0,09 \text{ mgL}^{-1}$; a equação que representa a relação concentração-resposta é: $y = 33,33x - 50$, com R^2 de 0,83 (Figura 4).

Nas concentrações de $0,0$; $0,01$; $0,03$ e $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ não ocorreu mortalidade. Em $0,07 \text{ mgL}^{-1}$ ocorreu 33% de mortalidade e na concentração de $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ocorreu 100% de mortalidade.

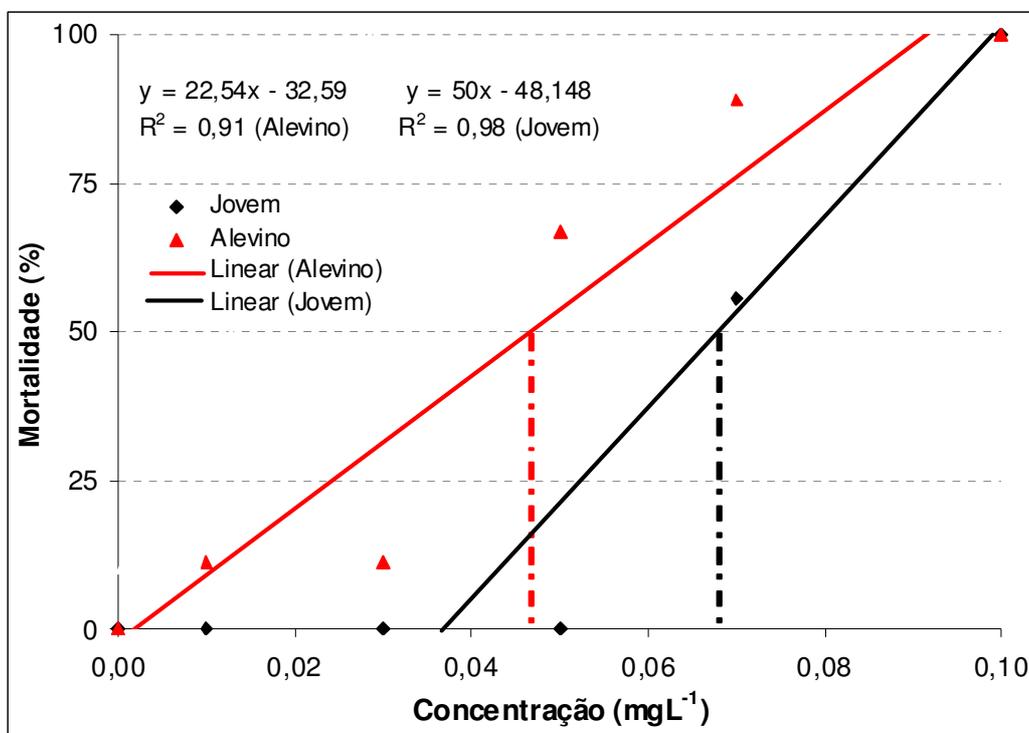


Figura 4. Relação concentração-mortalidade do triclorfon para o pacu durante o teste de toxicidade aguda.

5.2. Efeito sub-letal do triclofon em alevinos de pacu após teste de toxicidade aguda (avaliação histológica)

Brânquia

No tratamento controle, a brânquia apresentou-se organizada em quatro lamelas primárias de onde se formam as lamelas secundárias. As lamelas e os espaços são envolvidos por células mucosas. Além dessas células, estão presentes células caliciformes secretoras de muco, substâncias neutras e células-cloreto (Figura 5A).

No tratamento com $0,03 \text{ mgL}^{-1}$ ocorreu desarranjo da estrutura de sustentação da lamela secundária, hiperplasia das células mucosas no espaço inter-lamelar e de células-cloreto (Figura 5B).

Nos tratamentos com $0,05$ e $0,07 \text{ mgL}^{-1}$ ocorreu edema sub-epitelial na lamela secundária e hiperplasia de células caliciformes. Neste tratamento ocorreu maior desarranjo na estrutura de sustentação da lamela secundária (Figura 5C e D).

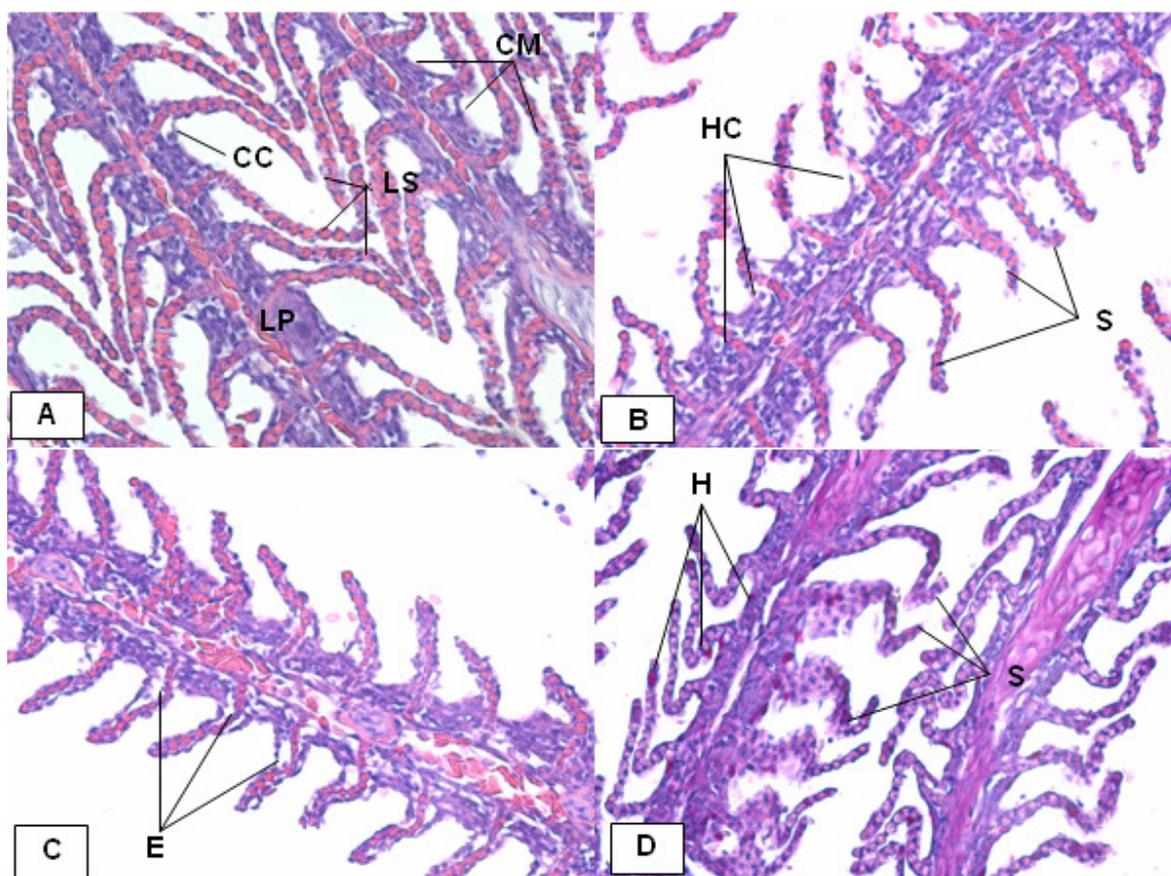


Figura 5. Fotomicrografia de brânquia de pacu durante o teste de toxicidade aguda. **Em A)** Lamela primária (LP), lamela secundária (LS), célula-cloreto (CC) e células mucosas (CM). Tratamento controle. H.E. 400x. **Em B)** Desarranjo da estrutura da lamela secundária (S) e hiperplasia das células cloreto (HC). Tratamento 0,03 mg/L. H.E. 400x. **Em C)** Ocorrência de edema subepitelial (E). Tratamento 0,05 mg/L. H.E. 400x. **Em D)** Hiperplasia de células caliciformes (H) e desarranjo da estrutura das lamelas secundárias. Tratamento 0,07 mg/L. PAS. 400x.

Fígado

Histologicamente, o fígado dos pacus no tratamento controle apresentou no parênquima hepático, fibras de tecido conjuntivo que sustentam os hepatócitos organizados em um arranjo cordonal ao longo dos capilares sinusóides. Os hepatócitos apresentaram forma hexagonal, levemente arredondada, com núcleo central (Figura 6A). No citoplasma ocorreu a presença de pequenos grânulos de glicogênio (PAS-positivo).

No tratamento com $0,03 \text{ mgL}^{-1}$ ocorreu desarranjo da estrutura cordonal dos hepatócitos (Figura 6B) e, em algumas regiões ocorreu hipertrofia destas células,

com citoplasma mais claro (aumento da acidofilia). Neste tratamento ocorreu acúmulo de glicogênio no interior dos hepatócitos (Figura 6B).

Nos tratamentos de 0,05 e 0,07 mgL⁻¹ ocorreu fusão celular, sendo que a hipertrofia dos hepatócitos ocorreu em varias regiões do tecido (Figura 6C). O acúmulo de glicogênio foi semelhante ao tratamento 0,03 mgL⁻¹. Em 0,07 mgL⁻¹ onde ocorreu ainda aumento do diâmetro dos capilares sinusóides (Figura 6D).

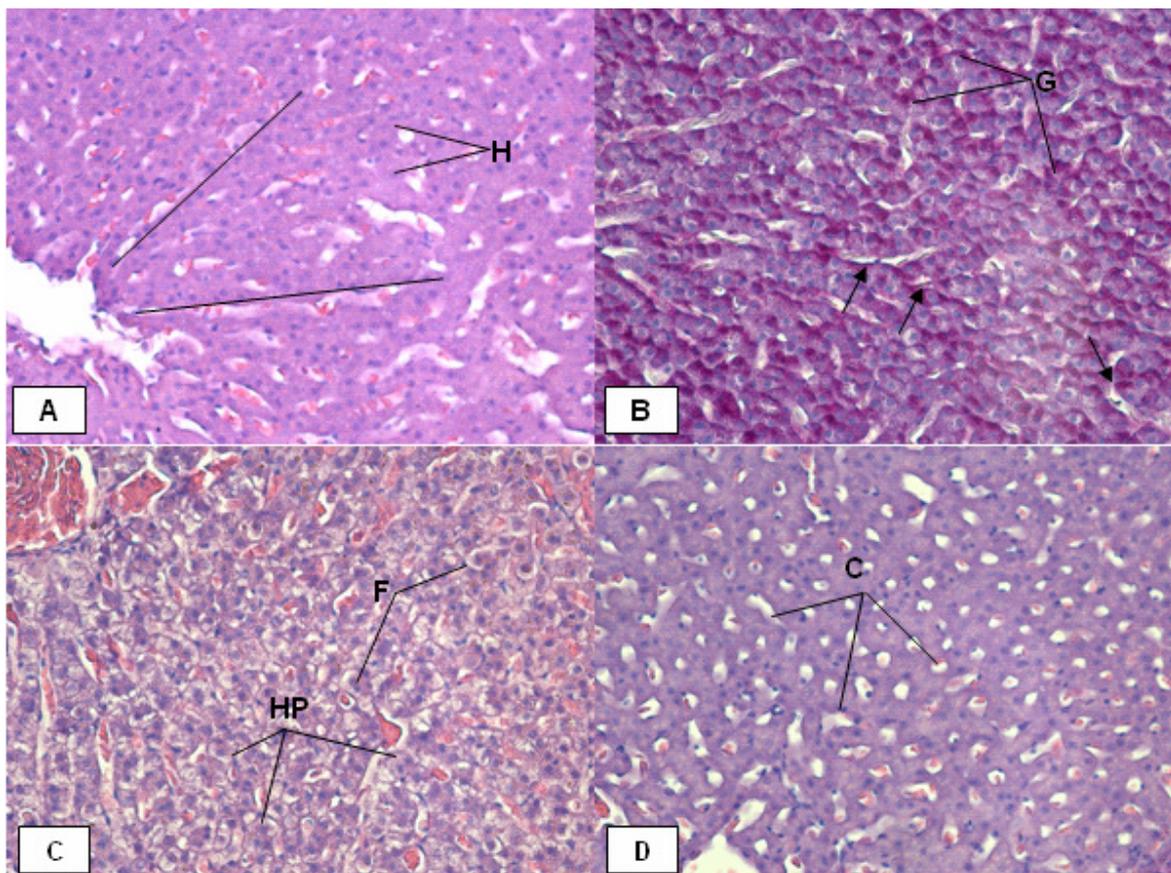


Figura 6. Fotomicrografia de fígado de pacu durante o teste de toxicidade aguda. **Em A).** Hepatócitos (H), arranjo cordonal (traços). Tratamento controle. H.E. 400x. **Em B)** Desarranjo cordonal (seta) e grânulos de glicogênio (G). Tratamento 0,03 mg/L. PAS. 400x. **Em C)** Hipertrofia dos hepatócitos (HP) e fusão celular (F). Tratamento 0,05 mg/L. H.E. 400x. **Em D)** Aumento do diâmetro dos capilares sinusóides. Tratamento 0,07 mg/L. H.E. 400x.

Rim

O rim de pacu (*P. mesopotamicus*) controle e 0,03 mgL⁻¹ apresentou-se organizado no túbulo contorcido proximal, túbulo contorcido distal e corpúsculo renal. O corpúsculo renal é composto pelo glomérulo e pela cápsula renal,

distribuídos ao longo do tecido. Os glomérulos são constituídos por capilares que se anastomosam em seu interior. Os túbulos contorcidos proximais são alongados e as suas células de revestimento são cúbicas ou colunares com microvilosidades, formando a borda em escova. Os túbulos contorcidos distais são circulares e as suas células de revestimento são cúbicas com microvilosidades (Figura 7A). Entre as estruturas renais ocorre a presença de tecido hematopoiético.

Nos tratamentos de 0,05 e 0,07 mgL⁻¹ ocorreu o aumento da cápsula renal e o glomérulo se despreendeu da cápsula (Figura 7B).

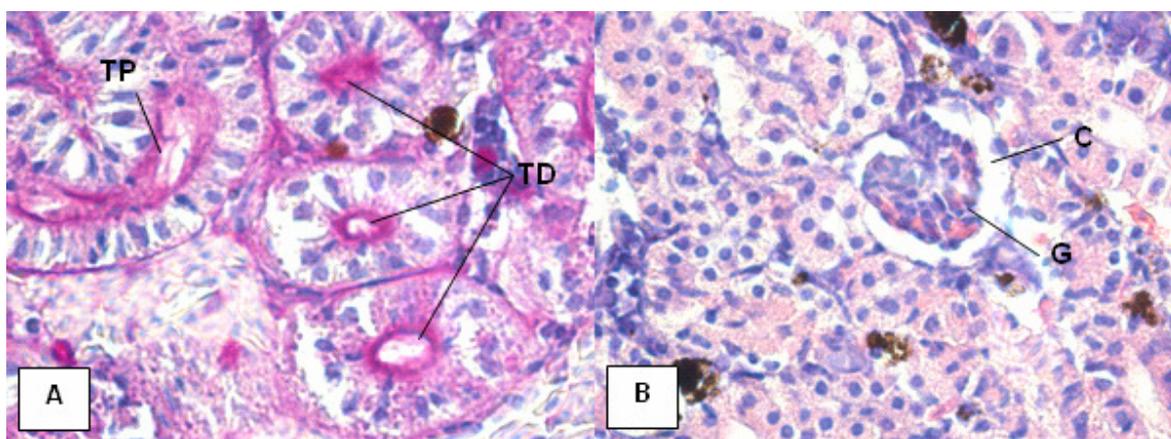


Figura 7. Fotomicrografia de rim de pacu durante o teste de toxicidade aguda. **Em A).** Túbulo contorcido proximal (TP) e túbulos distais (TD). Tratamento controle. PAS. 1000x. **Em B)** Cápsula renal aumentada (C) e glomérulo (G). Tratamento 0,05 mg/L. H.E. 1000x.

Pele

A pele do tratamento controle e em 0,03 mgL⁻¹ é composta histologicamente pela epiderme, com células pavimentares e algumas células caliciformes secretoras de muco (Figura 8A), e pela derme, com uma camada de tecido conjuntivo denso que sustenta a escama (Figura 8A). Entre a epiderme e a derme há a presença de cromatóforos que produzem a melanina, um pigmento marrom escuro. Abaixo da derme ocorre uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo com cromatóforos, chamada de hipoderme (Figura 8A). No tratamento com 0,03 mgL⁻¹ os cromatóforos estão mais concentrados na epiderme do que na hipoderme (Figura 8B).

Nos tratamentos de 0,05 e 0,07 mgL⁻¹ a estrutura da pele é semelhante ao

controle, porém os cromatóforos estão mais concentrados na epiderme (Figura 8C) do que na hipoderme.

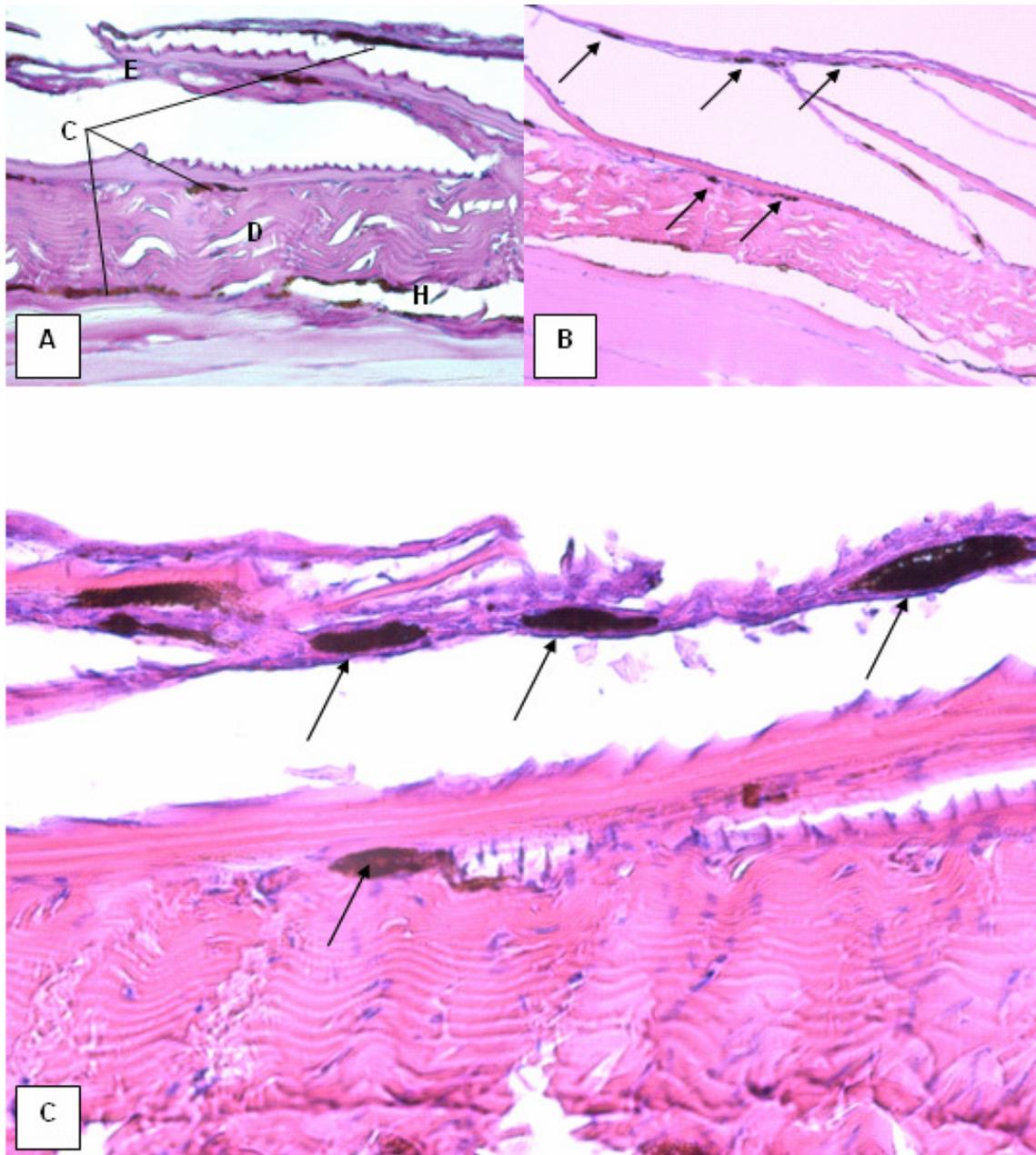


Figura 8. Fotomicrografia de pele de pacu durante o teste de toxicidade aguda. **Em A)** Epiderme (E), Derme (D), Hipoderme (H) e cromatóforos (C). Tratamento controle. PAS. 400x. **Em B)** Aumento dos cromatóforos (seta) na epiderme Tratamento 0,03 mg/L. H.E. 200x. **Em C)** Aumento dos cromatóforos (seta) na epiderme. Tratamento 0,05 mg/L. H.E. 400x.

5.3. Exposição sub-letal e recuperação de sete e 14 dias

Não houve mortalidade dos peixes durante os períodos de exposição e de recuperação, tanto em tanques expostos como nos tanques controle.

Foi realizada a exposição sub-letal de 96 horas a $0,0084 \text{ mgL}^{-1}$ de triclorfon (10% da (CL (I)50;96h). Após o período de exposição, houve a renovação da água para dar início à recuperação de sete dias. Após o término dos sete dias de recuperação, procedeu-se a recuperação de 14 dias.

Durante todo o período experimental, as variáveis de qualidade de água não foram alteradas significativamente: temperatura de $27,2 \pm 0,03 \text{ }^{\circ}\text{C}$; oxigênio dissolvido de $8,07 \pm 0,5 \text{ mgL}^{-1}$, pH de $7,7 \pm 0,1$, condutividade elétrica de $0,175 \text{ }\mu\text{S/cm}$, amônia de $0,5 \pm 0,1 \text{ mgL}^{-1}$ (ABNT, 2006).

5.3.1. Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos

Os valores referentes à análise dos parâmetros hematológicos e aos índices hematimétricos estão apresentados na Tabela 1. Após a exposição sub-letal, os valores de hematócrito, a contagem de eritrócitos (RBC), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram diferença significativa quando comparados aos seus controles. Os valores de hemoglobina total dos peixes expostos apresentaram uma redução de 9,6% quando comparados ao controle.

Após a recuperação de sete dias, os valores de HCM dos peixes recuperados por sete dias apresentaram redução de 5,9% quando comparados ao controle, e as demais variáveis avaliadas não apresentaram alterações significativas quando comparados ao controle.

Após recuperação de 14 dias, o valor do hematócrito dos peixes recuperados apresentou redução de 9,2% quando comparados ao controle. Os demais parâmetros hematológicos e hematimétricos avaliados não mostraram diferenças significativas.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão dos parâmetros hematológicos e dos índices hematimétricos do pacu após exposição ao triclofon por 96 horas e após sete e 14 dias de recuperação.

| Variável | Tempo de avaliação | | | | | |
|--|--------------------|---------------------|----------------------|-------------|-----------------------|--------------|
| | Controle exposição | Exposição sub-letal | Controle Rec. 7 dias | Rec. 7 dias | Controle Rec. 14 dias | Rec. 14 dias |
| Hematócrito (%) | 31,03±1,7 | 31,16±2,5 | 29,33±2,8 | 26,13±6,3 | 29,76±2,9 | 27,00±2,6 * |
| Hb total (g 100mL ⁻¹) | 7,70±0,7 | 6,96±0,9 * | 7,83±0,6 | 7,49±1 | 8,12±0,4 | 7,75±0,6 |
| RBC (10 ⁶ cél/mm ³) | 1,54±0,2 | 1,43±0,3 | 1,72±0,1 | 1,74±0,1 | 1,65±0,1 | 1,57±0,1 |
| VCM (μmm ³) | 189,08±57,9 | 227,82±57,3 | 171,35±21,1 | 160,34±24,1 | 179,64±11,8 | 172,61±18,9 |
| HCM (pg célula ⁻¹) | 49,29±5,7 | 48,85±8,1 | 45,75±4,73 | 43,01±5,5 * | 50,34±4,0 | 49,58±5,5 |
| CHCM (g dL ⁻¹) | 25,00±3 | 22,50±3,7 | 26,84±2,4 | 26,95±4,2 | 27,78±2,7 | 28,85±2,8 |

O (*) indica que houve diferença significativa quando comparado ao controle (p<0,05).

5.3.2. Intermediários metabólicos e enzimas

5.3.2.1. Exposição sub-letal ao triclorfon

As médias e os desvios-padrão das variáveis metabólicas analisadas no fígado, músculo branco e plasma dos peixes submetidos à exposição sub-letal do triclorfon e seus respectivos controles estão apresentadas na Tabela 2. O modelo do perfil metabólico de pacu após exposição sub-letal de triclorfon por 96 horas está apresentado no Apêndice A.

No fígado dos peixes submetidos à exposição sub-letal do triclorfon por 96 horas, ocorreu diminuição significativa dos níveis de amônia (14,7%) quando comparados ao controle. Foi observado também um aumento significativo (13,28%) nos níveis de aminoácidos livres quando comparados ao controle. Além disso, os níveis de glicose hepática dos peixes expostos aumentaram em 22,5%, quando comparados ao controle. As demais variáveis analisadas não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle.

No músculo branco dos peixes expostos, ocorreu diminuição significativa do piruvato (39,5%) e dos ácidos graxos livres (27,5%). As alterações do metabolismo protéico foram: diminuição da amônia (23,2%) e aumento dos aminoácidos livres (11,92%). Foi observado também um aumento significativo na glicose muscular (37,4%). Não houve diferença significativa nas demais variáveis analisadas.

No plasma dos peixes expostos, houve diminuição da glicose (14,5%) e de triacilgliceróis (24,5%). Além disso, foram observadas alterações no metabolismo protéico, evidenciadas pelo aumento da proteína (8,2%) e diminuição da amônia (26,6%). Apenas estas variáveis apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão das variáveis metabólicas do fígado, músculo e plasma do pacu após 96 horas de exposição sub-letal ao triclorfon.

| Variável | Exposição sub-letal 96 horas | | | | | |
|------------------|------------------------------|---------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | Fígado | | Músculo | | Plasma | |
| | Controle | Exposto | Controle | Exposto | Controle | Exposto |
| Amônia | 56,64± 10,5 | 48,26± 9,6 * | 3,48 ± 0,1 | 2,67±0,4 * | 3,18±0,6 | 2,33±0,6 * |
| Proteína | 4,96 ±0,7 | 4,75± 0,4 | 21,34±2,1 | 22,56±1,1 | 2,09±0,1 | 2,27±0,1* |
| Aminoácidos | 45,04± 5,1 | 51,01± 13,2 * | 25,97±3,5 | 29,07±4,0 * | 5,57±1,1 | 6,18±1,0 |
| ALAT | 31,33± 6,7 | 29,74± 8,0 | 0,359±0,1 | 0,367±0,1 | ----- | ----- |
| ASAT | 42,13± 4,9 | 38,75± 9,7 | 15,96±3,7 | 15,43±4,1 | ----- | ----- |
| Lactato | 3,25± 0,4 | 3,46± 0,6 | 96,61±12,4 | 92,60±12,2 | 4,30±0,9 | 4,53±1,3 |
| Piruvato | 0,41± 0,1 | 0,39± 0,04 | 0,58±0,2 | 0,35±0,05 * | 0,40±0,1 | 0,38±0,1 |
| Ácidos Graxos | 18,18± 5,2 | 23,20± 7,6 | 2,24±0,4 | 1,62±0,6 * | ----- | ----- |
| Triacilgliceróis | 8,50± 2,9 | 10,0± 3,8 | 2,37±0,7 | 2,06±0,5 | 0,82±0,1 | 0,62±0,1 * |
| Glicose | 22,10± 3,8 | 27,08± 6,1 * | 0,24±0,05 | 0,34±0,06 * | 3,63±0,5 | 3,10±0,4 * |
| Glicogênio | 425,36± 156,6 | 519,88± 207,4 | 14,10±1,8 | 14,51±0,9 | ----- | ----- |
| FAC | 63,01± 7,2 | 62,90± 6,1 | 4,46±0,7 | 4,60±1,4 | 0,29±0,07 | 0,30±0,08 |
| FAL | 21,24± 1,5 | 19,09± 1,6 | 2,52±0,2 | 2,80±0,4 | 169,40±54,1 | 143,60±13,0 |

As concentrações de proteína estão expressas em mg de proteína g de tecido⁻¹; as concentrações de glicogênio estão expressas em μmol de glicosil-glicose g de tecido⁻¹; os demais intermediários estão expressos em μmol g de tecido⁻¹; a atividade específica das enzimas está expressa como UI mg de proteína⁻¹. O (*) indica que houve diferença significativa quando comparado ao controle (p<0,05).

Após o período de exposição sub-letal, a atividade específica da AChE cerebral de pacu apresentou redução de 15,5% quando comparada ao seu controle. No músculo branco de pacu exposto ao triclorfon, não houve diferença significativa na atividade da AChE no período de exposição. As médias e o erro padrão da atividade específica da AChE estão representados na Figura 9.

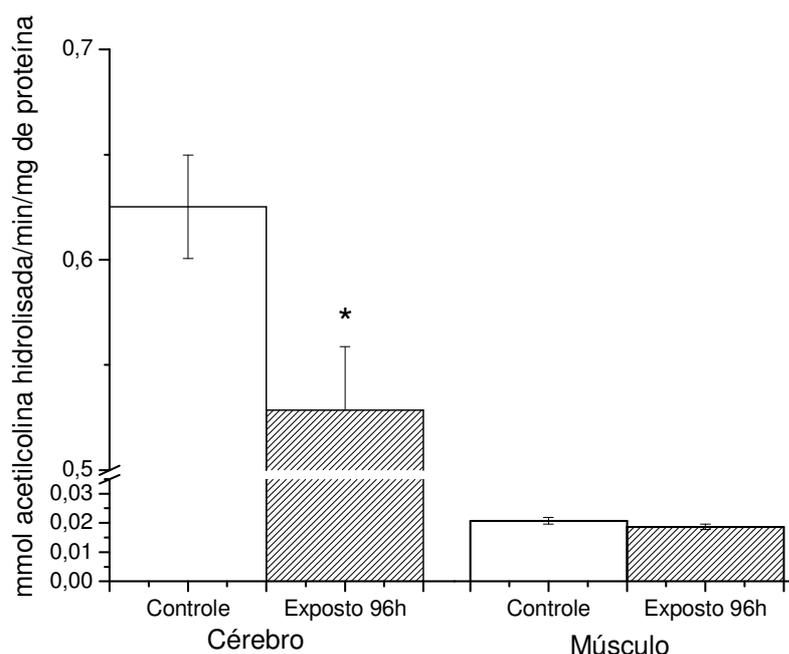


Figura 9. Atividade específica da acetilcolinesterase cerebral e muscular de *P. mesopotamicus* exposto ao triclorfon por 96 horas. O (*) indica a existência de diferença significativa das médias para $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.2.2. Recuperação de sete dias

As médias e os desvio-padrão das variáveis metabólicas analisadas no fígado, músculo e plasma dos peixes submetidos à recuperação por 7 dias e seus respectivos controles estão apresentados na Tabela 3. O modelo do perfil metabólico de pacu após recuperação por 7 dias está apresentado no Apêndice B.

Após permanência de sete dias em água livre do xenobiótico, o fígado dos peixes apresentou aumento significativo do piruvato (10,3%) e diminuição significativa do glicogênio (24,7%). As atividades específicas da FAC e da FAL

hepáticas apresentaram aumento de 35,9% e 32,6%, respectivamente. Não houve diferença significativa nas demais variáveis analisadas.

A amônia e os aminoácidos livres do músculo dos peixes recuperados por sete dias apresentaram diminuição de 23,1% e 10,5%, respectivamente. A glicose muscular aumentou em 16,32% quando comparada ao controle. A atividade da FAC muscular apresentou redução de 18,1%, enquanto que houve aumento de 27,4% na atividade da FAL. As demais variáveis analisadas não apresentaram diferença significativa.

No plasma dos peixes recuperados por 7 dias, observou-se diminuição da concentração de lactato (37,3%) e aumento na concentração de aminoácidos livres (20,48%). Houve diminuição de 21% na atividade da FAL plasmática de pacu. Não houve diferença significativa nas demais variáveis analisadas.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão das variáveis metabólicas do fígado, músculo e plasma do pacu após a recuperação de sete dias.

| Variável | Recuperação de sete dias | | | | | |
|------------------|--------------------------|--------------|-----------|------------|-------------|--------------|
| | Fígado | | Músculo | | Plasma | |
| | Controle | Recuperado | Controle | Recuperado | Controle | Recuperado |
| Amônia | 67,39±11,4 | 67,77±11,8 | 31,70±5,3 | 24,35±1,7* | 4,16±0,8 | 3,40±1,1 |
| Proteína | 11,18±1,5 | 11,19±1,2 | 17,82±2,8 | 19,40±2,2 | 2,21±0,3 | 2,14±0,1 |
| Aminoácidos | 33,15±7,7 | 34,68±4,5 | 11,99±1,3 | 10,73±1,7* | 5,19±0,9 | 6,25±1,4* |
| ALAT | 20,55±5,9 | 24,88±3,7 | 0,44±0,1 | 0,41±0,06 | ----- | ----- |
| ASAT | 28,70±2,9 | 26,17±2,8 | 17,14±6,4 | 15,44±3,1 | ----- | ----- |
| Lactato | 4,02±0,7 | 3,60±0,5 | 41,98±7,0 | 43,15±5,1 | 6,15±1,0 | 3,85±0,8* |
| Piruvato | 0,54±0,03 | 0,59±0,04* | 0,40±0,08 | 0,40±0,09 | 0,36±0,08 | 0,35±0,09 |
| Ácidos Graxos | 20,20±4,5 | 20,77±3,7 | 2,15±0,6 | 1,81±0,3 | ----- | ----- |
| Triacilgliceróis | 4,32±1,5 | 4,06±1,4 | 2,28±0,5 | 2,51±0,4 | 0,92±0,2 | 0,86±0,1 |
| Glicose | 40,60±7,4 | 46,10±9,0 | 0,84±0,07 | 0,98±0,1* | 3,91±1,1 | 3,87±0,9 |
| Glicogênio | 319,65±94,4 | 240,58±77,2* | 14,87±0,8 | 15,87±1,9 | ----- | ----- |
| FAC | 31,77±3,4 | 43,18±9,9* | 5,55±0,9 | 4,54±0,8* | 0,25±0,05 | 0,27±0,09 |
| FAL | 15,96±4,3 | 21,18±5,1* | 2,35±0,3 | 2,99±0,6* | 174,19±47,5 | 137,67±43,3* |

As concentrações de proteína estão expressas em mg de proteína g de tecido⁻¹; as concentrações de glicogênio estão expressas em μmol de glicosil-glicose g de tecido⁻¹; os demais intermediários estão expressos em μmol g de tecido⁻¹; a atividade específica das enzimas está expressa como UI mg de proteína⁻¹. O (*) indica que houve diferença significativa quando comparado ao controle (p<0,05).

A atividade da AChE cerebral de pacu recuperado por 7 dias apresentou diminuição significativa de 21,5%, enquanto que a atividade desta enzima no músculo diminuiu em 31,1% quando comparados ao controle (Figura 10).

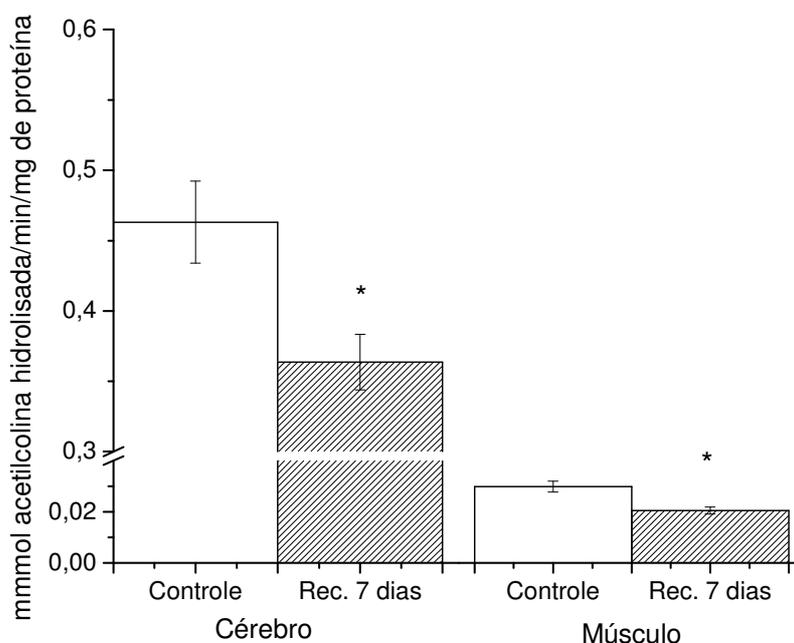


Figura 10. Atividade específica da acetilcolinesterase cerebral e muscular de *P. mesopotamicus* recuperado por 7 dias. O (*) indica diferença significativa das médias para $p < 0,05$ em relação ao controle de cada experimento.

5.3.2.3. Recuperação de 14 dias

As médias e os desvios-padrão das variáveis metabólicas analisadas no fígado, músculo e plasma dos peixes submetidos à recuperação por 14 dias e seus respectivos controles estão apresentados na Tabela 4. Os peixes submetidos à recuperação de 14 dias apresentaram diminuição de 22,4% na concentração de lactato hepático. A atividade da ASAT aumentou em 13,2% no fígado durante a recuperação de 14 dias. As demais variáveis metabólicas analisadas no fígado dos peixes não apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis metabólicas analisadas no músculo e no plasma de pacu submetido a 14 dias de recuperação.

Tabela 4. Médias e desvios-padrão das variáveis metabólicas do fígado, músculo e plasma do pacu após a recuperação de 14 dias.

| Recuperação de 14 dias | | | | | | |
|------------------------|--------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|
| Variável | Fígado | | Músculo | | Plasma | |
| | Controle | Recuperado | Controle | Recuperado | Controle | Recuperado |
| Amônia | 83,61±9,9 | 81,92±8,4 | 39,86±5,0 | 39,02±3,2 | 4,52±0,6 | 4,19±0,6 |
| Proteína | 10,01±1,4 | 9,85±1,6 | 16,23±1,8 | 17,35±2,0 | 2,69±0,2 | 2,84±0,3 |
| Aminoácidos | 36,36±5,5 | 34,39±3,5 | 12,30±1,4 | 12,61±1,5 | 5,17±0,7 | 4,97±1,1 |
| ALAT | 4,81±2,5 | 2,88±1,2 | 0,43±0,1 | 0,38±0,1 | ----- | ----- |
| ASAT | 10,91±0,9 | 12,35±1,5* | 18,63±4,6 | 17,66±4,3 | ----- | ----- |
| Lactato | 5,79±0,8 | 4,49±0,8* | 54,57±6,8 | 57,92±7,1 | 4,57±0,5 | 4,68±1,0 |
| Piruvato | 0,57±0,05 | 0,56±0,03 | 0,58±0,1 | 0,60±0,2 | 0,40±0,07 | 0,42±0,06 |
| Ácidos Graxos | 16,61±2,3 | 14,51±1,9 | 2,33±0,6 | 2,57±0,6 | ----- | ----- |
| Triacilgliceróis | 3,19±0,4 | 3,39±0,6 | 3,17±0,7 | 3,45±0,6 | 0,91±0,2 | 0,63±0,2 |
| Glicose | 62,88±22,3 | 54,56±6,4 | 0,81±0,03 | 0,89±0,1 | 2,74±0,5 | 2,91±0,4 |
| Glicogênio | 352,79±129,5 | 351,51±78,0 | 15,72±0,9 | 15,20±0,8 | ----- | ----- |
| FAC | 32,59±6,2 | 33,02±5,5 | 5,64±0,5 | 5,76±1,1 | 0,12±0,06 | 0,10±0,03 |
| FAL | 15,31±2,7 | 14,72±2,7 | 2,90±0,7 | 2,61±0,5 | 90,84±23,8 | 84,96±24,3 |

As concentrações de proteína estão expressas em mg de proteína g de tecido⁻¹; as concentrações de glicogênio estão expressas em μmol de glicosil-glicose g de tecido⁻¹; os demais intermediários estão expressos em μmol g de tecido⁻¹; a atividade específica das enzimas está expressa como UI mg de proteína⁻¹. O (*) indica que houve diferença significativa quando comparado ao controle (p<0,05).

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da AChE cerebral e muscular após o período de recuperação de 14 dias (Figura 11).

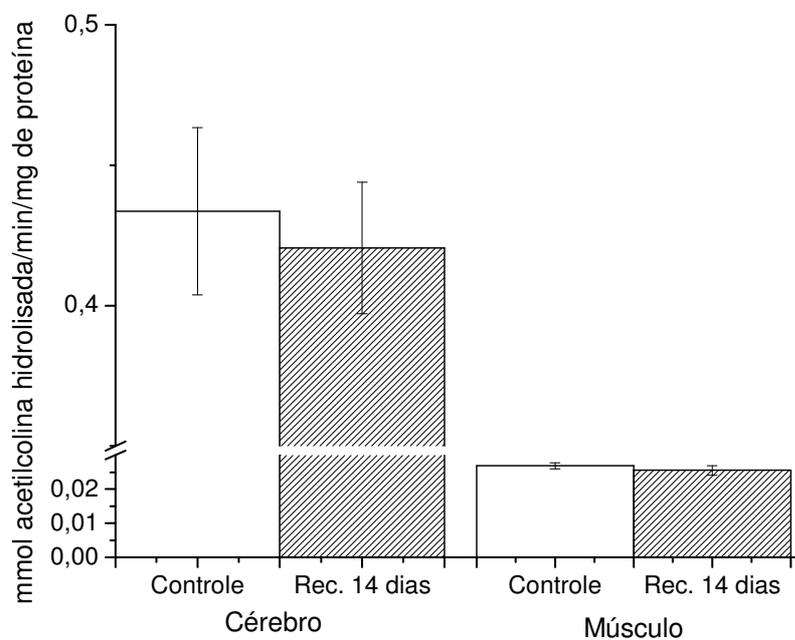


Figura 11. Atividade específica da acetilcolinesterase cerebral e muscular de *P. mesopotamicus* recuperado por 14 dias.

6. DISCUSSÃO

6.1. Teste de toxicidade aguda do triclorfon para alevinos e jovens de pacu

Segundo Dutta e colaboradores (1995), indivíduos em estágios iniciais de desenvolvimento de qualquer espécie são mais susceptíveis a agentes estressores do que os indivíduos adultos. Tal fato é confirmado pelos valores de CL (I)50;96h encontrados neste estudo, pois os alevinos mostraram-se mais sensíveis ao triclorfon do que os jovens de pacu.

De acordo com Zucker (1985), que classifica o potencial de perigo ambiental de agrotóxicos de acordo com o valor da CL50, o triclorfon pode ser considerado extremamente tóxico para alevinos e jovens de *P. mesopotamicus*, visto que sua concentração letal 50% < 0,1 mg L⁻¹.

De acordo com YOSHIMURA e ENDOH (2005), conforme a degradação do triclorfon na água aumenta, mais alta é a toxicidade aos organismos aquáticos devido ao aumento na concentração de seu produto de degradação, o diclorvos.

O triclorfon na formulação Masoten[®], foi mais tóxico para o *P. mesopotamicus* que o triclorfon em outras formulações para diferentes espécies de peixes (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de CL50;96h de espécies de peixes expostas ao triclorfon.

| Espécie | Valor da CL50;96h | Autores |
|---|--------------------------|--------------------------------------|
| <i>Cyprinus carpio</i> | 15 mg L ⁻¹ | Hashimoto et al. (1982) |
| <i>Procambarus clarkii</i> | 0,73 mg L ⁻¹ | Cebrian et al. (1991) |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | 21,7 mg L ⁻¹ | Alkahem et al. (1998) |
| <i>Cherax destructor</i> | 0,093 mg L ⁻¹ | Qin e Dong (2004) |
| <i>Oryzias latipes</i> | 17,6 mg L ⁻¹ | Yoshimura e Endoh (2004) |
| <i>Piaractus mesopotamicus</i> | 0,19 mg L ⁻¹ | Mataqueiro et al. (2008) |
| <i>Cichlasoma urophthalmus</i> | 17,2 mg L ⁻¹ | Flores-Nava e Vizcarra-Quiroz (2008) |
| <i>Colossoma macropomum</i> | 0,82 mg L ⁻¹ | Rocha (2009) |
| <i>Piaractus mesopotamicus</i> (jovem) | 0,07 mg L ⁻¹ | Presente trabalho |

As respostas dos organismos aquáticos aos inseticidas OP dependem do tipo do composto, do tempo de exposição, da qualidade da água e da espécie (FISHER, 1991). Uma melhor padronização dos testes de toxicidade poderia reduzir as variações devidas a diferenças no delineamento experimental (MATAQUEIRO et al. 2008).

Segundo a resolução CONAMA n.20 (BRASIL, 1986), a concentração limite de organofosforados em águas de classe I (destinadas à criação natural ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana) é de 0,01 mgL⁻¹. A resolução CONAMA n. 357 (BRASIL, 2005) não dispõe sobre organofosforados em geral, apenas sobre o malation (0,1 µgL⁻¹) e o paration (0,04 µgL⁻¹) em águas de classe II, as quais são destinadas à aqüicultura e à atividade de pesca. Todas as concentrações letais médias apresentadas na Tabela 5 e as obtidas no presente estudo estão acima da concentração limite de OP estabelecida pela resolução CONAMA n.20.

6.2. Efeito sub-letal do triclorfon para alevinos de pacu após teste de toxicidade aguda (avaliação histológica)

Brânquia

As brânquias são extremamente importantes na respiração, osmorregulação, balanço ácido-base e excreção de resíduos nitrogenados em peixes, representando a primeira área de contato do animal com o ambiente externo. Além disso, a morfologia branquial é considerada um indicador útil no monitoramento ambiental. As alterações branquiais como aumento na altura e hiperplasia das células epiteliais, podem ser consideradas adaptativas, visto que aumentam a distância entre o ambiente externo e o sangue, servindo como barreira a entrada de xenobióticos (SEPICI-DINÇEL et al. 2009).

No presente trabalho, algumas das alterações encontradas na brânquia de pacu podem ser consideradas adaptativas, visto que protegem o organismo da entrada de xenobióticos. No entanto, as alterações observadas nas brânquias de pacu como hiperplasia e edema, podem reduzir a eficiência da lamela branquial em realizar suas funções fisiológicas, visto que, de acordo com Fanta e colaboradores (2003), o aumento da distância de difusão gasosa na brânquia pode levar a uma absorção de oxigênio menos eficiente.

Em brânquias de *Oreochromis niloticus* exposto a 0.25 mgL^{-1} de triclorfon por quatro horas, ocorre edema na lamela secundária, fusão lamelar, hipertrofia celular média e moderada e proliferação celular. Após oito horas de exposição, é observada também congestão sangüínea (GUIMARÃES et al. 2007).

As brânquias de *Cirrhinus mrigala* exposto a $1,92$ e $3,84 \text{ mgL}^{-1}$ do OP monocrotophos exibiram hiperplasia epitelial, aneurisma, necrose epitelial, descamação, levantamento epitelial, edema e enrolamento da lamela secundária (VELMURUGAN et al. 2007).

Segundo Mataqueiro e colaboradores (2008), as brânquias de pacu expostos a $0,05$ e $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de triclorfon (Sigma[®]) durante 24 horas apresentam hiperplasia nas lamelas primárias e secundárias, talengectasia da lamela secundária, focos de edema sub-epitelial e de congestão sangüínea.

Fígado

Durante a exposição de peixes a xenobióticos, os poluentes são primeiramente absorvidos pelas brânquias e pele dos animais. Após tal absorção, esses agentes químicos atingem o fígado, que tem papel fundamental no seu metabolismo (JOBILING e SUMPTER, 1993).

O aumento do diâmetro dos capilares sinusóides indica aumento no fluxo sanguíneo do fígado, sugerindo uma estratégia de eliminação dos resíduos produzidos por este órgão para posterior excreção renal ou branquial. A exposição do pacu ao triclorfon causou poucas alterações hepáticas.

Segundo Melo e colaboradores (2008), o fígado de jundiá (*Rhamdia quelen*) exposto a $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ do OP metil paration apresenta perda de contorno celular, núcleo picnótico e descaracterização do endotélio do retículo endoplasmático rugoso após quatro horas de exposição. Após 48 e 72 horas de exposição, ocorre aumento dos focos de necrose; o número de hepatócitos com pigmento biliar aumenta significativamente em 72 horas de exposição.

Em pacus expostos a $0,025 \text{ mgL}^{-1}$ de triclorfon (Sigma[®]) por 24 horas, os hepatócitos perdem sua forma normal, o núcleo desloca-se para a periferia e ocorre fusão celular após 2, 7 e 15 dias da exposição. Em peixes expostos a $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ de triclorfon por 24 horas, ocorre as mesmas alterações imediatamente após a exposição, bem como hepatócitos necróticos e hipertrofia celular (MATAQUEIRO et al. 2008).

O fígado de *Prochilodus lineatus* exposto a 25 mgL^{-1} do inseticida diflubenzuron durante 96 horas apresenta aumento do núcleo e do volume celular, degeneração citoplasmática e nuclear, vacuolização nuclear e estagnação da bile (MADUENHO e MARTINEZ, 2008).

O fígado é considerado o órgão mais importante na desintoxicação de xenobióticos. Visto que o tamanho dos hepatócitos reflete seu estado funcional, a hipertrofia pode ser considerada uma resposta ao estresse que não compromete as funções normais do órgão (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

A maioria dos xenobióticos é biotransformada em metabólitos pelo fígado, através de enzimas das frações solúveis da mitocôndria e do retículo

endoplasmático liso, sendo que em alguns casos os metabólitos são mais tóxicos que o produto original (FANTA et al. 2003). Isso é o que ocorre quando o triclorfon é transformado em diclorvos; quanto maior o avanço da decomposição do triclorfon na água, maior é sua toxicidade aos organismos aquáticos pelo aumento no nível do diclorvos (YOSHIMURA e ENDOH, 2005).

Rim

Em peixes, assim como em todos os vertebrados superiores, o rim apresenta importantes funções relacionadas ao balanço hídrico e eletrolítico e a manutenção de um ambiente interno estável. O rim excreta produtos nitrogenados do metabolismo como amônia, uréia e creatinina (CENGIZ, 2006). O rim recebe a maior parte do sangue pós-branquial, o que torna as lesões renais bons indicadores de poluição ambiental (ORTIZ et al. 2003). A exposição de peixes a agentes tóxicos, como pesticidas, pode causar alterações histológicas no epitélio tubular e nos glomérulos (VELMURUGAN et al. 2007).

De acordo com os dados aqui apresentados, o rim de pacu exposto ao triclorfon apresentou poucas alterações, as quais são indicativas de aumento de excreção.

Quando expostos a $1,13 \text{ mgL}^{-1}$ do OP diazinon por 7 dias, os rins de *Anabas testudineus*, *Channa punctatus* e *Barbodes gonionotus* apresentam degeneração tubular, necrose, picnose e hemorragia (RAHMAN et al. 2002). Bhuiyan e colaboradores (2001) encontraram as mesmas alterações em rins de *C. punctatus* expostos a 100 mgL^{-1} do OP sumithion por 7 dias.

O tecido renal de *Prochilodus lineatus* exposto a $0,2 \mu\text{L L}^{-1}$ de triclorfon na formulação DiptereX 500[®] apresenta aumento do espaço intercapsular com atrofia glomerular, hipertrofia das células do túbulo renal, com pequenos grânulos no citoplasma e pouca alteração nuclear após 24 horas de exposição (VEIGA et al. 2002).

Segundo Mataqueiro e colaboradores (2008), o rim de pacus expostos a $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ de triclorfon (Sigma[®]) durante 24 horas apresentam diminuição da espessura da cápsula glomerular e aumento do espaço intercapsular com atrofia

glomerular, após 2 dias da exposição. Foi observado também centros melano-macrófagos, os quais atuam no seqüestro de produtos de degradação celular e materiais que possam ser tóxicos ao tecido (AGIUS e ROBERTS, 2003).

Pele

Embora nos peixes a pele seja um dos órgãos primeiramente afetados por xenobióticos e possua um papel importante na resistência a patógenos e químicos estressores (SHEPHARD, 1994), há poucos relatos na literatura sobre a histopatologia de pele, especialmente em peixes com escamas.

A derme de pacu apresenta uma camada superficial com fibras finas, juntas e entrelaçadas, sem diferenciação quanto à disposição das mesmas e uma camada profunda, com fibras mais finas e espaçadas; e à medida que se distanciam da epiderme, os feixes de fibras tornam-se mais espessos, juntos e entrelaçados (SOUZA et al. 2003).

Segundo Rajan e Banerjee (1991), a epiderme de *Heteropneustes fossilis* exposto a $0,3 \text{ mgL}^{-1}$ de cloreto de mercúrio secreta grande quantidade de muco, principalmente devido à hiperatividade das células globosas as quais são degeneradas e perdidas. Todos os outros tipos celulares acabam envolvidos no processo degenerativo.

Segundo Oshima (2000), o neurotransmissor periférico que sinaliza os cromatóforos é adrenérgico. Geralmente, a agregação de grânulos de pigmento ocorre em resposta à norepinefrina, e a transmissão é tida como α -adrenérgica na natureza, onde a dispersão de pigmentos é causada via receptores β -adrenérgicos nos cromatóforos de algumas espécies de peixes. Pode-se inferir que a distribuição dos cromatóforos na epiderme de pacu exposto ao triclorfon obedece a esse padrão, sendo que, em resposta ao estresse causado pelo xenobiótico, ocorre agregação dos pigmentos em camadas superficiais da epiderme.

6.3. Exposição sub-letal e recuperação

6.3.1. Parâmetros hematológicos e parâmetros hematimétricos

A avaliação dos parâmetros hematológicos pode ser útil no monitoramento do estado de saúde dos peixes, visto que sua interpretação é importante em relação aos fatores intrínsecos e extrínsecos que podem influenciar a aparência das células e os valores quantitativos obtidos (CLAUSS et al. 2008).

A única alteração observada nos parâmetros hematológicos e hematimétricos do pacu durante a exposição sub-letal (10% da CL 50;96h por 96 horas) foi a diminuição da hemoglobina total dos peixes expostos quando comparados ao controle. Tavares e colaboradores (1999) observaram que o *P. mesopotamicus* exposto a 0,2 mgL⁻¹ de triclorfon durante 48 horas apresenta redução significativa nos níveis de RBC e hemoglobina total. O catfish (*S. glanis*) exposto a 1 mgL⁻¹ do OP diazinon por 96 horas apresenta, além de redução da hemoglobina total, redução do RBC, de leucócitos, no hematócrito, VCM, CHM e CHCM (KÖPRÜCÜ et al. 2006). A redução observada na hemoglobina total desse catfish é atribuída à ação interruptora do xenobiótico no tecido eritropoiético, sendo que a viabilidade das células pode ser afetada. A carpa comum (*Cyprinus carpio*) exposta a 60 e 120 µgL⁻¹ OP diazinon apresentou queda significativa na contagem de eritrócitos, no valor do hematócrito e na hemoglobina total (BANAEE et al. 2008). O *P. lineatus* exposto a 25 mgL⁻¹ do inseticida diflubenzuron por 96 horas apresenta redução significativa da hemoglobina total e do RBC, paralelamente ao aumento do VCM em relação ao controle (MADUENHO e MARTINEZ, 2008).

A alteração observada neste estudo após 96 horas de exposição mostra uma condição anêmica dos animais, que pode ser devida à redução na síntese das células vermelhas do sangue. Esta condição pode levar a uma diminuição da capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos. Todavia, os dados de metabolismo apresentados neste trabalho não sugerem preponderância de metabolismo anaeróbico nos tecidos avaliados, visto que não há aumento da concentração de ácido láctico.

Após a recuperação de sete dias, a redução no HCM sugere ocorrência de

anemia microcítica. O matrinxã (*Brycon cephalus*) exposto a 2 ppm do OP metil paration por 12 e 24 horas apresenta redução nos valores de hematócrito e aumento do HCM no grupo exposto ao pesticida por 24 horas (AGUIAR, 2002), dados que não corroboram os encontrados no presente estudo. De acordo com o autor deste trabalho, tais variações são indicativas de anemia hemorrágica. Hemorragia pontual ou hemólise geralmente resultam em anemia microcítica porque eritrócitos imaturos perfazem a maioria das células na circulação periférica e são menores do que eritrócitos maduros. A presença de eritrócitos imaturos na circulação não é certamente sinal de anemia regenerativa; células imaturas podem estar presentes em resposta a estressores ambientais, como hipóxia, tóxicos ou mudanças na temperatura (CLAUSS et al. 2008).

Os eritrócitos dos peixes teleósteos possuem núcleo, diferentemente dos eritrócitos de mamíferos. Além disso, comparados aos animais terrestres, os eritrócitos presentes na circulação periférica dos peixes teleósteos são dinâmicos e heterogêneos, tanto no que concerne à sua estrutura quanto à fisiologia. Eritrócitos em vários estágios de desenvolvimento podem ser encontrados na circulação dos peixes, como células maduras, jovens, em divisão, e senescentes (Elahee e Bhagwant, 2007). Tendo em vista que os achados no metabolismo intermediário do pacu neste estudo não confirmam hipóxia e a temperatura manteve-se constante durante o período experimental, é provável que a redução do HCM após a recuperação de sete dias tenha sido causada pela exposição anterior ao triclorfon.

Segundo Clauss e colaboradores (2008), mudanças hematológicas associadas ao estresse podem persistir por vários dias após a remoção do agente estressor. Após a recuperação de 14 dias, foi observada uma redução no hematócrito de *P. mesopotamicus*. De acordo com Svoboda e colaboradores (2001), a carpa comum (*C. carpio*) exposta por 96 horas a 32,5 mgL⁻¹ do OP diazinon apresenta queda nos valores de RBC, hemoglobina total e hematócrito. Chandrasekara e Pathiratne (2005) observaram que a exposição de *Cyprinus carpio* a 0,25 e 0,50 mgL⁻¹ do triclorfon por 1 e 24 horas não altera o valor do hematócrito dos animais. Ainda segundo estes autores, essa variável

hematológica não mostra alteração após sete dias de recuperação da exposição. Rocha (2009) avaliou o hematócrito, a hemoglobina total, o RBC, o CHM, VCM e CHCM de tambaqui (*C. macropomum*) exposto a 0,125 e 0,25 mgL⁻¹ de triclorfon por 96 horas e não observou diferenças significativas entre os peixes expostos e o controle.

Há evidências de que o aumento nos valores de parâmetros hematológicos em peixes expostos a xenobióticos seja devido à lesão do tecido branquial, que produz hipóxia interna, levando ao estímulo da eritropoiese (AREECHON e PLUMB, 1990). Tendo em vista que neste trabalho os pacus expostos ao triclorfon apresentaram uma sutil diminuição dos parâmetros hematológicos, sem dano maior para o transporte de oxigênio, os dados do metabolismo intermediário ficam assim fortalecidos.

6.3.2. Intermediários metabólicos e enzimas

Além da estimativa quantitativa de mortalidade, os efeitos adversos de concentrações subletais de xenobióticos alteram certos processos biológicos, principalmente o metabolismo. Estas alterações podem ser avaliadas utilizando-se biomarcadores de poluição e de efeitos específicos causados por exposição a pesticidas (SEPICI-DINÇEL et al. 2009). Os peixes são particularmente sensíveis à contaminação ambiental e, além disso, os xenobióticos podem danificar certos processos fisiológicos e bioquímicos ao acessarem os órgãos dos animais (AGRAHARI et al. 2007). Devido à sensibilidade dos peixes às mudanças bióticas e abióticas do ambiente em que vivem, o interesse em entender os mecanismos fisiológicos dos peixes associados às respostas ao estresse ambiental vem crescendo (SANCHO et al. 2009).

O estresse é um mecanismo de compensação fisiológica que o organismo adota em resposta ao fator físico ou químico que atua como o agente estressor. E as variáveis bioquímicas são muito sensíveis a concentrações sub-letais de agentes estressores (SANCHO et al. 1998).

Assim, a avaliação das respostas metabólicas de pacu (*P. mesopotamicus*) frente à exposição ao triclorfon mostrou que estas foram responsivas, visando um

aumento da demanda metabólica para a desintoxicação do organismo.

6.3.2.1. Exposição sub-letal ao triclorfon

Os biomarcadores do metabolismo intermediário do músculo branco de pacu mostraram um aumento da glicose muscular. Tendo em vista que os estoques de glicogênio muscular permaneceram inalterados, essa glicose foi provavelmente oriunda do plasma, compartimento onde se observou uma diminuição desta concentração. A manutenção dos níveis de glicogênio muscular permite inferir que, mesmo sob a ação do triclorfon nas condições experimentais, não houve aumento significativo de glicogenólise. Os valores de piruvato muscular reduziram sem que se observasse aumento do lactato; o que é indício do fornecimento de acetil-CoA para manutenção do funcionamento do ciclo do ácido cítrico e formação de NADH para os processos catabólicos. Este fato condiz com os parâmetros hematológicos obtidos, os quais sugerem metabolismo aeróbico no músculo branco.

O aumento de aminoácidos livres no músculo indica que esses intermediários podem ter sido utilizados na produção de oxalacetato. Esta suposição sustentaria o provável catabolismo de ácidos graxos neste tecido sugerido pela redução significativa dos teores de ácidos graxos livres; o oxaloacetato é fundamental à entrada de acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico. Desta forma, o catabolismo de ácidos graxos explicaria a diminuição de triacilgliceróis plasmáticos, que estariam sendo utilizados como fonte primária de energia no músculo branco.

No fígado, a redução de amônia seguida do aumento nas concentrações de aminoácidos é sugestiva de sua produção significativa. A biossíntese de aminoácidos estaria ocorrendo para satisfazer a demanda de síntese protéica aumentada para prover os processos de desintoxicação. Outra possibilidade é que o aumento de aminoácidos livres no fígado seja devido a uma importação de alanina, oriunda do músculo. O pequeno aumento de glicose observado no tecido hepático seria então devido a um processo neoglicogênico, visto que os teores de glicogênio permanecem constantes e, apesar de não significativa, observa-se

discreta redução das concentrações de piruvato. A redução da glicose plasmática seria então entendida visto o seu consumo muscular pelo ciclo da glicose-alanina.

De acordo com Gupta (1974) *apud* Jyothi e Narayan (1999), a condição hiperglicêmica induzida por pesticidas pode ser explicada em parte pela inibição da colinesterase nos locais neuroefetores na medula adrenal, levando a uma hipersecreção de adrenalina que estimula a quebra de glicogênio à glicose. Admite-se ainda, que os organofosforados têm um importante papel na homeostase da glicose corporal (RAHIMI e ABDOLLAHI, 2007). Embora não tenha sido observado aumento da glicose plasmática no presente estudo, os níveis de glicose muscular e hepática mostraram-se aumentados.

O peixe *Clarias batrachus* exposto a concentrações sub-letais do OP phorate por 24, 72, 120 e 168 horas apresentou aumento nos níveis de glicose plasmática, fosfatase alcalina e bilirrubina (JYOTHI e NARAYAN, 1999). Os autores concluem que a exposição ao OP altera o metabolismo de carboidratos.

Segundo Hori e colaboradores (2006), o matrinxã exposto a 2 mgL⁻¹ de fenol por 96 horas apresenta queda nos níveis de glicogênio e glicose hepáticos, sendo que o mesmo foi observado na glicose muscular, o que sugere uso dos estoques de carboidratos, dados que são diferentes dos apresentados no presente trabalho. De acordo com Vijayavel e colaboradores (2006), situações de estresse em peixes disparam respostas neuroendócrinas, as quais induzem distúrbios no metabolismo de carboidratos; assim, a glicogenólise no músculo e no fígado dos animais expostos a xenobióticos pode ser devido ao aumento de catecolaminas circulantes induzido pelo estresse.

O aumento no requerimento de energia inferido através do perfil metabólico de pacus expostos ao triclorfon, seria devido aos processos de desintoxicação e não a quadro de jejum, visto que os peixes do tratamento controle também permaneceram nessa condição fisiológica. O aumento no requerimento de energia dos peixes expostos ao pesticida seria, portanto, para a manutenção dos processos homeostáticos.

O peixe *Channa punctatus* exposto a 0,96 e 1,86 mgL⁻¹ do OP monocrotophos por 15 e 60 dias também exhibe queda nos níveis de glicose

plasmática (AGRAHARI et al. 2007). De acordo com esses autores, concentrações de glicose plasmática reduzidas refletem o estresse causado por resposta mediada por hormônios. Segundo Levesque e colaboradores (2002), peixes submetidos à poluição ambiental podem exibir maior renovação de glicose, sendo que maior quantidade de glicose pode ser produzida a partir de substratos que não sejam carboidratos.

Os níveis aumentados de proteína plasmática sugerem possível dano tecidual, embora não existam dados que corroborem essa hipótese. Matrinxã exposto a 2 mgL^{-1} de fenol por 96 horas apresenta níveis aumentados de proteína e redução nos níveis de cloreto (HORI et al. 2006). Segundo esses autores, o aumento nos níveis de proteína contribui para a redução nos níveis de cloreto, sendo essa uma maneira de manutenção do balanço iônico.

Tendo em vista que os níveis de lactato nos três tecidos estudados não se alteraram, podemos inferir que não houve diminuição no aporte de oxigênio tecidual, uma vez que condições de hipóxia celular levam ao metabolismo anaeróbico e conseqüente aumento nos níveis de ácido láctico.

As aminotransferases são, normalmente, enzimas intracelulares, de modo que os baixos níveis observados no plasma representam a liberação de conteúdos celulares durante a renovação celular normal. Níveis plasmáticos elevados de aminotransferases indicam lesão em células ricas nessas enzimas. Visto que os dados experimentais das aminotransferases plasmáticas mostraram valores ínfimos, provavelmente o pacu não sofreu lesões em tecidos ricos nestas enzimas, tais como fígado e musculatura cardíaca; por isso estes dados foram omitidos. Não houve diferença significativa nas atividades da ALAT e da ASAT hepática e muscular neste período.

Durante exposição a 2 mgL^{-1} de metil paration por 96 horas, matrinxã apresenta redução significativa na atividade da ALAT hepática e aumento na atividade da ALAT plasmática. Em 48 horas de recuperação, a atividade enzimática hepática é restabelecida aos níveis anteriores à exposição, enquanto que a atividade da ALAT plasmática permanece alta (AGUIAR et al. 2004). A tilápia (*Oreochromis mossambicus*) exposta a $1,15 \text{ mgL}^{-1}$ do OP monocrotophos

por 3, 7, 15 e 30 dias exibiu aumento da atividade da ALAT e da ASAT no plasma e no rim, enquanto no fígado e nas brânquias a atividade dessas enzimas diminuiu (RAO, 2006).

A excreção dos peixes também não foi afetada pela exposição ao triclorfon, pois as concentrações musculares, hepáticas e plasmáticas de amônia diminuíram após as 96 horas de exposição.

A fosfatase ácida é uma enzima lisossomal que hidrolisa os fosfo-ésteres em meio ácido. Assim, essa enzima é hidrolítica e atua como uma das várias hidrolases no processo de autólise após a morte celular (AGRAHARI et al. 2007). A fosfatase alcalina catalisa a desfosforilação de várias moléculas incluindo nucleotídeos, proteínas, e alcalóides em pH alcalino. Sabe-se que a fosfatase alcalina está envolvida no metabolismo de carboidratos, crescimento e diferenciação, síntese protéica, síntese enzimática, atividade secretória, e transporte de intermediários fosforilados através das membranas celulares (AGRAHARI e GOPAL, 2009). A atividade da FAC e da FAL plasmática de *Channa punctatus* exposto ao OP azodrin (monocrotophos) não apresenta diferença significativa após 15 dias de exposição a uma concentração sub-letal. Entretanto, após 60 dias de exposição, a atividade destas enzimas aumenta significativamente no plasma dos animais (AGRAHARI et al. 2007).

Considerando-se que não houve alterações nas fosfatases ácida e alcalina avaliadas no fígado, músculo e plasma de pacu exposto ao triclorfon por 96 horas, é plausível inferir que não houve dano celular, corroborando as inferências feitas com os dados de concentrações plasmáticas de aminotransferases.

6.3.2.2. Recuperação de sete dias

Os carboidratos são usualmente a fonte primária de energia em casos de estresse, e a exposição aos xenobióticos causa reduções tanto nos níveis de glicogênio muscular como hepáticos (HORI et al. 2006). Nos hepatócitos dos pacus expostos por 96 horas ao triclorfon e recuperados por sete dias, foi observada redução nos níveis de glicogênio hepático, seguida pelo aumento nos níveis de glicose muscular, fato indicativo de glicogenólise hepática. A glicose

resultante seria transportada para o músculo para fins energéticos.

Em *Anguilla anguilla* exposta a $0,04 \text{ mgL}^{-1}$ de fenitrothion por 96 horas, também ocorre glicogenólise, sendo que esta condição permanece mesmo após a transferência dos animais para água livre do xenobiótico (SANCHO et al. 1998). A exposição de *Oreochromis mossambicus* a 4 mgL^{-1} OP monocrotophos por 96 horas causou queda nos níveis de glicogênio hepático e muscular, bem como aumento nos níveis de lactato e piruvato nos mesmos tecidos (VIJAYAVEL et al. 2006). Esses autores também calcularam a razão lactato/piruvato, o que indicou que os peixes estavam sob estresse químico.

A redução dos aminoácidos livres do músculo branco pode ser explicada pela sua transferência para o fígado, para gerar esqueletos carbônicos por desaminação e estes, utilizados na gliconeogênese hepática. Este fato suporta o aumento de piruvato e conseqüente conversão em glicose. Neste período de recuperação, também ocorre o ciclo da glicose-alanina, visto que a glicose sintetizada pelo fígado é transportada pelo sangue para ser utilizada no músculo.

A diminuição do lactato no plasma sugere sua captação pelo fígado, onde pode ser oxidado a piruvato, aumentando suas concentrações e contribuindo para a gliconeogênese. Portanto, mesmo após sete dias de recuperação, os peixes ainda apresentaram um requerimento maior de energia, visando à manutenção da homeostase.

O *Chana punctatus* exposto a duas concentrações sub-letais do OP monocrotophos por 30 dias também apresenta queda nos níveis de aminoácidos livres no músculo branco. Essa alteração foi acompanhada de queda nos níveis de proteína, carboidratos, glicogênio e lipídeos. O peixe apresentou ainda aumento na atividade da ALAT e ASAT renal, e queda na atividade dessas enzimas no fígado, brânquias e músculo (AGRAHARI e GOPAL, 2009).

Não houve diferença significativa nas atividades da ALAT e da ASAT hepática e muscular após recuperação do pacu por 7 dias em água livre de triclorfon.

Há relatos de que as alterações nas atividades das FAC e FAL em diferentes tecidos podem ser resultantes de perturbações nas membranas

celulares e de danos teciduais provocados por xenobióticos ou substâncias tóxicas (MOLINA et al., 2005; SANCHO et al., 2009), ou ainda de atividade osteoblástica aumentada ou obstrução intra ou extra-hepática na passagem da bile (JYOTHI e NARAYAN, 1999). O aumento na atividade da FAL muscular e hepática sugere um aumento na mobilização lisossomal e algum dano celular devido à toxicidade do triclorfon. O aumento da atividade de enzimas, como as fosfatases ácida e alcalina presentes no plasma, é um indicador convencional de dano hepático. Quando a membrana do hepatócito é danificada, várias enzimas normalmente presentes no citosol são liberadas na corrente sanguínea, sendo marcadores quantitativos úteis de dano hepatocelular (RAO, 2006b). Tendo em vista que, neste período de avaliação, a atividade da FAL plasmática foi reduzida e a atividade da FAC permaneceu equivalente ao controle, admite-se que não houve danos nos hepatócitos, dados confirmados pela avaliação das transaminases.

Segundo Rao (2006b), a tilápia (*Oreochromis mossambicus*) exposta a uma concentração sub-letal do organofosforado RPR-V por 30 dias apresenta aumento da atividade da FAC e da FAL plasmática e renal, entretanto, no fígado é observada diminuição da atividade destas enzimas. Após recuperação por sete dias, a atividade destas enzimas retorna aos níveis de pré-exposição. A mesma espécie de peixe exposta ao OP monocrotophos por 30 dias apresenta aumento na atividade da FAL e da FAC plasmática, branquial e renal, e redução na atividade destas enzimas no fígado (RAO, 2006).

De acordo com Agrahari e Gopal (2009), o *Channa punctatus* exposto ao OP monocrotophos por 30 dias apresenta aumento nas atividades da FAC e da FAL branquial, muscular e renal, enquanto que a atividade destas enzimas no fígado diminuiu em relação ao controle.

Admite-se que a fosfatase alcalina hepática desempenha um importante papel no metabolismo do glicogênio e é capaz de inativar as fosforilases, promovendo a síntese de glicogênio. A inibição da atividade da FAL é então relacionada com a quebra do glicogênio para suprir a demanda energética sob estresse (SAHA e KAVIRAJ, 2009). Embora os níveis de glicogênio hepático tenham diminuído neste estudo, a atividade da FAL hepática aumentou. Assim,

infere-se que tal aumento não foi suficiente para a síntese de glicogênio e manutenção de seus níveis, ou ainda que a demanda energética foi demasiadamente elevada, o que causou a queda nos níveis deste intermediário não obstante o aumento da FAL.

Os peixes expostos ao triclorfon apresentam uma demanda metabólica aumentada, visando à desintoxicação. Este aumento pode contribuir para maior produção da FAL muscular e hepática, após a recuperação de 7 dias.

6.3.2.3. Recuperação de 14 dias

A maioria das modificações metabólicas do pacu exposto ao triclorfon e recuperado por sete dias não persistiu após 14 dias de recuperação. A sutil queda na concentração de lactato hepático e o aumento na atividade específica da ASAT hepática, as quais foram as únicas alterações observadas neste período, não permitem inferências a respeito das adaptações metabólicas. Sendo assim, pode-se dizer que, em vista da não permanência de alterações metabólicas, o pacu superou o estresse causado pelo xenobiótico e restabeleceu sua homeostasia.

O esgotamento do glicogênio é um passo regulatório contra os danos causados por poluentes. Ele aumenta o metabolismo intermediário, o que resulta na proteção dos hepatócitos. No entanto, sabe-se que se o estresse for removido, pela transferência dos peixes para água livre do xenobiótico, o nível de glicogênio pode ser recuperado (SAHA e KAVIRAJ, 2009). Os resultados deste estudo confirmam tal idéia, pois os níveis de glicogênio hepático que encontravam-se mais baixos que o controle na recuperação de sete dias, retornaram aos níveis do controle após a recuperação de 14 dias.

A tilápia (*Oreochromis mossambicus*) exposta a $1,15 \text{ mgL}^{-1}$ do OP monocrotophos por 30 dias apresenta aumento nas atividades da ALAT e da ASAT plasmática e renal, enquanto que a atividade destas mesmas enzimas diminui no fígado e nas brânquias. Após recuperação de sete dias em água livre do xenobiótico, a atividade dessas enzimas é recuperada (RAO, 2006).

A *Anguilla anguilla* exposta ao fenitrothion por 96 horas também exhibe recuperação do metabolismo intermediário após 8 dias em água livre do

xenobiótico (SANCHO et al., 1998). Segundo esses autores, tais achados são importantes na avaliação do potencial ecotóxico dos pesticidas em ambientes aquáticos e também nas possíveis implicações para a população de peixes. Os pesticidas podem causar sérios danos populacionais, visto que afetam não só a sobrevivência dos animais, mas também a reprodução, ingestão de alimentos, crescimento e o metabolismo como um todo.

A ausência de diferenças nas atividades da FAC e da FAL nos tecidos estudados sugere que essa atividade é recuperável no pacu após 14 dias em água livre do xenobiótico.

Atividade específica da AChE - neurotoxicidade

A AChE é uma enzima chave no processo de transmissão do impulso nervoso, sendo responsável pela hidrólise da acetilcolina em acetato e colina. Durante a transmissão normal do impulso nervoso, a acetilcolina é liberada na sinapse para excitar um receptor. Se ela não for rapidamente hidrolisada, a célula pós-sináptica será constantemente excitada, resultando em estimulação contínua. Os organofosforados são conhecidamente inibidores da acetilcolinesterase, e assim esperar-se-ia que a exposição aos mesmos produza este efeito, visto que este é o principal modo de ação destes xenobióticos.

A maioria dos OPs que apresentam uma ligação P=S são inibidores fracos da AChE. Eles são metabolicamente ativados pelo CYP450_S para produzir análogos oxigenados, os quais são inibidores potentes da AChE. Assume-se que a inibição desta enzima pela exposição a inseticidas organofosforados é resultado do seu análogo oxigenado, e não do composto primário (DE BLEECKER, 2008). Tal fato pode ter ocorrido após a exposição sub-letal do pacu ao triclorfon, pois houve inibição da atividade da AChE cerebral neste período de avaliação.

Mesmo após o período de exposição sub-letal e recuperação em água livre do xenobiótico por sete dias, houve inibição da atividade da AChE muscular e cerebral de *P. mesopotamicus*. O peixe *Channa striata* exposto a quatro doses do OP diazinon por quatro dias e recuperado em água livre do xenobiótico por duas semanas, continua a apresentar inibição significativa na atividade da AChE

(CONG, 2009). A enguia (*A. anguilla*), o bagre do mar (*Dicentrarchus labrax*) e a truta arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) expostos a 0,1 ppm do OP azametiphos por 60, 120 e 240 minutos e recuperados por 21 dias em água livre do xenobiótico apresentam inibição significativa da atividade da AChE (INTORRE et al. 2004).

Ao expor exemplares de *Oreochromis mossambicus* a três diferentes organofosforados (MCP, RPR-II e RPR-V), Rao e colaboradores (2004) demonstraram que os animais apresentam inibição significativa da atividade da AChE no cérebro, brânquias e músculo após 96 horas de exposição. A atividade da enzima é recuperada em todos os tecidos, primeiro nos peixes expostos ao MCP e depois naqueles expostos aos outros compostos.

Exemplares de *Aphanius iberus* expostos a 1 mgL^{-1} de diclorvos por 96 horas apresentam inibição da atividade da acetilcolinesterase (83,1% em fêmeas e 90,8% em machos) e, mesmo após recuperação de 96 horas, os níveis de atividade da enzima não retornam aos valores equivalentes àqueles anteriores à exposição (VARÒ et al. 2008).

O matrinxã exposto a 2 mgL^{-1} OP metil paration por 96 horas apresenta reduções drásticas na atividade da AChE plasmática e cerebral, sendo que essa condição permanece após oito dias de recuperação em água livre do xenobiótico (AGUIAR et al. 2004).

Outras espécies apresentam inibição da atividade da acetilcolinesterase quando expostas a diferentes OP, tais como *Gambusia affinis* exposto ao monocrotophos (KAVITHA e RAO, 2007); *Oreochromis niloticus* exposto ao triclorfon (GUIMARÃES et al. 2007); *Oreochromis mossambicus* exposto ao RPR-V (RAO, 2006c) e *Cyprinus carpio* expostos ao diclorvos (HAI et al. 1997).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é reconhecida como um dos mais antigos biomarcadores, e é sensível a pesticidas organofosforados e carbamatos, mas também responde a outros xenobióticos encontrados no meio ambiente (PAYNE et al. 1996). O bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) exposto a $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ de fenol por 96 horas apresenta redução na atividade da AChE cerebral após 14 dias de recuperação (MORAES, 2009); sendo que o matrinxã exposto a 2 mgL^{-1} do mesmo xenobiótico apresenta redução na atividade da AChE cerebral após 96

horas de exposição (AVILEZ, 2008). O *Rhamdia quelen* exposto por 96 horas a 600 e 700 mgL⁻¹ do inseticida 2,4-D apresenta aumento na atividade da AChE cerebral (CATTANEO et al. 2008).

Os dados presentes na literatura e os deste estudo demonstram que a redução da atividade da AChE ocorre devido à exposição aos OP, todavia essa redução e também a recuperação são dependentes do tipo de composto, da espécie avaliada e do tempo de exposição e recuperação. Segundo Dutta e colaboradores (1995), os efeitos inibitórios de organofosforados são dependentes de sua capacidade de ligar-se ao sítio ativo da enzima e de sua taxa de fosforilação em relação ao comportamento e a idade do organismo.

A ausência de diferença significativa na atividade da AChE cerebral e muscular de *P. mesopotamicus* após 14 dias de recuperação indica que a ação tóxica do triclorfon foi satisfatoriamente reduzida e ou plenamente eliminada.

7. CONCLUSÃO

Do presente trabalho pode-se concluir que:

- Alevinos de *P. mesopotamicus* são mais sensíveis ao triclorfon do que indivíduos jovens;

- Triclorfon é extremamente tóxico para alevinos e jovens de *P. mesopotamicus* sendo sua concentração letal 50% bem menor que para várias outras espécies estudadas;

- A brânquia de *P. mesopotamicus* adapta-se estruturalmente para aumentar as barreiras e dificultar a entrada do triclorfon, aumentando a eficiência de desintoxicação e de excreção, sendo que os demais tecidos analisados apresentam poucas alterações morfológicas;

- O metabolismo intermediário de *P. mesopotamicus* exposto ao triclorfon responde de forma a fornecer energia suficiente para manter homeostasia;

- O equilíbrio homeostático de *P. mesopotamicus* é restabelecido após 14 dias da exposição;

- A redução da atividade de AChE em *P. mesopotamicus* exposto a triclorfon é recuperável.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. Ecotoxicidade aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes. NBR 15088. 2006. p. 19.
- AGIUS, C., ROBERTS, R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology **J. Fish Dis.** n.26, p. 499-509, 2003.
- AGUIAR, L.H. **Efeitos do inseticida organofosforado methyl parathion (Folidol 600®) sobre o teleosteo de água doce, matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869): aspectos do metabolismo intermediário** Tese de doutorado –SP Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2002.
- AGUIAR, L.H., MORAES, G., AVILEZ, I.M., ALTRAN, A.E., CORRÊA, C.F. Metabolic effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus* **Environ. Res.** n. 95, p. 224-230, 2004.
- AGRAHARI, S., PANDEY, K.C., GOPAL, K. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch) **Pest. Biochem. Physiol.** n.88, p. 268-272, 2007.
- AGRAHARI, S., GOPAL, K. Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, *Channa punctatus* **Pest. Biochem. Physiol.** n.94, p.5-9, 2009.
- ALKAHEM, H.F., AHMED, Z., AL-AKEL, A.S., SHAMSI, M.J.K. Toxicity bioassay and changes in haematological parameters of *Oreochromis niloticus* induced by trichlorfon. **Arab. Gulf J. Sci. Res.** n. 16, p. 581-593, 1998.
- APHA. **Standard methods for examination of water and wastes**. 12. ed. Washington, DC: Join Editorial Board, 1980.
- AREECHON, N., PLUMB, J. Sublethal effects of malathion on channel catfish, *Ictalurus punctatus* **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** n.44, p. 435, 1990.
- AVILEZ, I.M. **Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix & Agassiz, 1829, characidae) exposto ao fenol** Tese de doutorado – SP Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- AYDIN, R., KÖPRÜCÜ, K. Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae **Pest. Biochem. Physiol.** n. 82, p. 220-

225, 2005.

BANAEE, M., MIRVAGEFEI, A.R., RAFEI, G.R., MAJAZI AMIRI, B. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry **Int. J. Environ. Res.** v.2, n.2, p. 189-198, 2008.

BARTON, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ. and Comp. Biol.** v. 42, p. 517-525, 2002.

BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response **Aquat. Toxicol.** n. 66, p. 83-92, 2004.

BEHMER, A.O. TOLOSA, E.M.C. FERITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 1976, 239p.

BERGMMEYER, H.U., SCHEIBE, P., WAHLEFELD, A. W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine transferase. **Clin. Chem.** v. 24, p. 58-73, 1978.

BERGMMEYER, H.U.; BEACH, W.D. **Methods of enzymatic analysis.** Weinheim Durfield Beach, Florida Bassel. 3.ed. 1983.

BHUIYAN, A.S., NESA, B., NESSA, Q. Effects of sumithion on the histological changes of spotted murrel, *Channa punctatus* (Bloch) **Pakistan. J. Biol. Sci.** n.4, v.10, p.1288-1290, 2001.

BIDINOTTO, P.M.; MORAES, G.; SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determination of micro samples. **Bol. Tec. CEPTA** n. 10, p. 53-60, 1997.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Portaria n.20, de 30 de julho de 1986. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 1986.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2005.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo – Sistemática. *In*: BRANCO, S.M. **Poluição e piscicultura**, São Paulo. Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai, USP, Faculdade de Saúde Pública; Instituto da Pesca de São Paulo, 1970. p. 79-108.

- CASILLAS, E., MEYERS, M., AMES, W. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride **Aquat. Toxicol.** n. 3, p. 61-78, 1983.
- CATTANEO, R., LORO, V.L., SPAVANELLO, R., SILVEIRA, F.A., LUZ, L., MIRON, D.S., FONSECA, M.B., MORAES, B.S., CLASEN, B. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide **Pest. Biochem. Physiol.** n.92, p. 133-137, 2008.
- CEBRIAN, C., ANDREU, E.S., FERRANDO, M.D. Degradation and acute toxicity of methidathion and trichlorfon on *Procambarus clarkia*, in experimental conditions **Toxicol. Environ. Chem.** n. 31/32, p. 321-327, 1991.
- CENGIZ, E.I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin **Environ. Toxicol. Pharmacol.** n.22, p. 200-204, 2006.
- CHANDRASEKARA, H.U., PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of trichlorfon on haematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquac. Res.** v. 36, n. 2, p. 144-149, 2005.
- CHROUSOS, G.P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 851, p. 311-335, 1998.
- CLAUSS, T.M., DOVE, A.D.M., ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish **Vet. Clin. Exot. Anim.** n. 11, p. 445-462, 2008.
- CONG, N.V., PHUONG, N.T., BAYLEY, M. Effects of repeated exposure of diazinon on cholinesterase activity and growth in snakehead fish (*Channa striata*) **Ecotox. Environ. Saf.** n. 72, p. 699-703, 2009.
- COPLEY, N.G. Alloxan and ninhydrin. **Analyst.** n. 66, p. 492-493, 1941.
- CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação in BALDISSEROTO, B., GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil** Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 23-36.
- CRUZ, C e CUBO, P. Eficácia do trichlorfon na formulação Masoten® no controle de monogénicos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) em condição de laboratório. **Anais...X Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Búzios-**

RJ, 363p. 2008.

CUBO, P. CRUZ, C. LUNA, L.A.V. Eficácia do trichlorfon na formulação Masoten® no controle de *Trichodina* sp. e de *Ichthyophthirius multifiliis* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em condição de laboratório **Anais...X** Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, Búzios-RJ, 371p. 2008.

DE BLEECKER, J.L. **Handbook of clinical neurology** 3rd edition Angel, A. G. 2008.

DRABKIN, D.L. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci.** n. 215, v. 1, p. 110-111, 1948.

DUBOIS, M.; GILES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERTS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** n. 28, p.350-358, 1956.

DUTTA, H.M., MUNSHI, J.S.D., DUTTA, G.R., SINGH, N.K., ADHIKARI, S. RICHMONDS, C.R. Age related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity of *Heteropneustes fossilis* (Bloch) by malathion **Comp. Biochem. Physiol.** n. 2, v. 111A, p. 331-334, 1995.

ELAHEE, K.B., BHAGWANT, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius **Ecotox. Environ. Saf.** n. 68, p. 361-371, 2007.

ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR., FEATHERSTONE, R.M. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity **Biochem. Pharmacol.** n. 7, p. 88-95, 1961.

FANTA, E., RIOS, F.S., ROMÃO, S., VIANNA, A.C.C., FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotox. Environ. Saf.** n.54, p. 119-130, 2003.

FENG, T., LI, Z.B., GUO, X.Q., GUO, J.P. Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulfate on antioxidant defense system and acetylcholinesterase of *Tilapia nilotica* in vitro. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, doi: 10.1016/j.pestbp.2007.10.002, 2007.

FISHER, S.W. Changes in the toxicity of the three pesticides as a function of

environmental pH and temperature **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** n. 46, p. 197-202, 1991.

FLORES-NAVA, A., VIZCARRA-QUIROZ, J.J. Acute toxicity of trichlorfon to fry of *Cichlasoma urophthalmus* Günther **Aquac. Res.** n. 4, v. 19, p. 341-345, 2008.

FUKUTO, T.R. Mechanism of action on organophosphorus and carbamate insecticides **Environ. Health Persp.** v.87, p. 245-254, 1990.

GENTZKOW, C.J.; MASEN, J.M. An inaccurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Chem.** n. 143, p. 531-544, 1942.

GOLDSTEIN, E.G.; CLYMO, R.S. **Methods for chemicals analysis of freshwater.** IBP Handbook n.8. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 171p., 1969.

GUIMARÃES, A.T.B., ASSIS, H.C.S., BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus* **Ecotox. Environ. Saf.** v. 68, n. 1, p. 57-62, 2007.

HAI, D.Q., VARGA, S.I., MATKOVICS, B. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) **Comp. Biochem. Physiol.** v. 117 C, n. 1, p. 83-88, 1997.

HAMILTON, M.A. RUSSO, R.C. THURSTON, V. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.** v. 7, p. 714-719, 1977.

HARROWER, J.R.G.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.** n. 32 v.5, p. 224-228, 1972.

HASHIMOTO, Y., OKUBO, E., ITO, T., YAMAGUCHI, M., TANAKA, S. Changes in susceptibility of carp to several pesticides with growth **J. Pesticide Sci.** n.7, p. 457-461, 1982.

HORI, T.S.F. **Impacto da exposição crônica ao fenol do metabolismo, fisiologia e resposta ao estresse de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*: Teleostei; Characidae)** Dissertação de mestrado – SP Universidade Federal de São Carlos, SP, 2005.

HORI, T.S.F., AVILEZ, I.M., INOUE, L.K., MORAES, G. Metabolical changes

induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles **Comp. Biochem. Physiol. Part C** n. 143, p. 67-72, 2006.

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Estatística da Pesca 2005, Brasil Grandes regiões e unidades da federação*. Brasília, 2007. 110 p.

INTORRE, L., SOLDANI, G., COGNETTI-VARRIALE, A.M., MONNI, G., MEUCCI, V., PRETTI, C. Safety of azamethinphos in eel, seabass and trout **Pharm. Res.** n. 49, p. 171-176, 2004.

JOBLING, S. e SUMPTER, J.P. Detergent components in seware effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic. Toxicol.** v. 27, p.3 61-372, 1993.

JOHNSON, L.L. STEHR, C.M. OLSON, O.P. MYERS, M.S. PIERCE, S.M. WIGREN, C.A. McCAIN, B.B. VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Envir. Scie. Technol.** v. 27, p. 2759-2771, 1993.

JOKANOVIĆ, M. Biotransformation of organophosphorous compounds **Toxicol.** n. 166, p. 139-160, 2001.

JYOTHI, B., NARAYAN, G. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.) **Food Chem. Toxicol.** n. 37, p. 417-421, 1999.

KHATTAK, I.U., HAFEEZ, M.A. Effect of malathion on blood parameters of the fish, *Cyprinion wabsoni* **Pak. J. Zool.** n. 28, p. 45-49, 1996.

KAVITHA, P., RAO, J.V. Oxidative stress and locomotos behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos **Pest. Biochem. Physiol.** n.87, p. 182-188, 2007.

KINKELIN, P. MICHEL, C. GHITTINO, P. **Tratado de las enfermedades de los peces**. Zaragoza, ed. Acribia, 1992, 353p.

KÖPRÜCÜ, S.S., KÖPRÜCÜ, K., URAL, M.S., ISPIR, Ü., PALA, M. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some

- hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.) **Pest. Biochem. Physiol.** n. 86, p. 99-105, 2006.
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification **Meth. Mol. Biol.** n.32, p. 9-15, 1994.
- KUBITZA, F., KUBITZA, L.M.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**, 3 ed, Piracicaba: Degaspari, 1998, 54p.
- LACKNER, R. Oxidative stress in fish by environmental pollutants **Fish Ecotoxicol.** p. 203-223. 1998.
- LEVESQUE, H.M., MOON, T.W., CAMPBELL, P.C.G., HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrates and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field **Aquat. Toxicol.** n. 60, p. 257-267, 2002.
- LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 4.ed., Guanabara Koogan, RJ, 653p.1969.
- LOPES, R.B., PARAIBA, L.C., CECCARELLI, P.S., TORNISIELO, V.L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) **Chem.** n. 64, p. 56-62, 2006.
- LU, G.D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.** n. 33, p. 249-254, 1939.
- MADUENHO, L.P., MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus* **Comp. Biochem, Physiol. Part C** n. 148, 0. 265-272, 2008.
- MATAQUEIRO, M.I., NAKAGHI, L.S.O., SOUZA, J.P., CRUZ, C., OLIVEIRA, G.H., URBINATI, E.C. Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon. **J. Appl. Ichthyol.** p.1-4, 2008.
- MELO, G.C., DONATTI, L., RUDNIKI, C.A.M., FANTA, E. Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600®. **Ecotox. Environ. Saf.** n.71, p. 821-829, 2008.
- MILAN, N. Clorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. **J. Lipid Res.** n. 6, p. 431-433, 1965.

MOLINA, R., MORENO, I., PICHARDO, S., JOS, A., MOYANO, R., MONTERDE, J.G., CAMEÁN, A. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. **Toxicon** v. 46, p. 725-735, 2005.

MORAES, F.D. **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*, RAFINESQUE, 1818) exposto a concentração sub-letal de fenol e recuperação** Dissertação Mestrado – SP. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Fish, Acute Toxicity Test..., 9p., 1992.

OLUAH, N.S. Plasma aspartate aminotransferase activity in the catfish *Clarias albopunctatus* exposed to sublethal zinc and mercury **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** n. 63, p. 343-349, 1999.

ORTIZ, J.B., DE CANALES, M.L.G., SARASQUETE, C. Histopathological changes induced by lindane (gamma-HCH) in various organs of fishes. **Sci. Mar.** n. 67, v.1, p.53-61, 2003.

ORUÇ, E.Ö., UTSA, D. Evaluatino of oxidative stress responses and neurotoxicity potencial of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio* **Env. Toxicol. Pharmacol.** n. 23, p. 48-55, 2007.

OSHIMA, N. Minute control of fish cromatophores by various factors **Trends Comp. Biochem. Phisiol.** v. 6, p. 109-116, 2000.

PACHECO, M., SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) **Ecotox. Environ. Saf.** n.53, p. 331-347, 2002.

PARMA de CROUX. M.J.; LOTESTE, A.; CAZENAVE, J. Inhibition of plasma cholinesterase and acute toxicity of monocrotophos in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 69, p. 356-363, 2002.

PAYNE, J.F., MATHIEU, A., MELVIN, W., FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers

and a paper mill in Newfoundland **Mar. Pollut. Bull.** n. 32, p. 225-231, 1996.

PEÑA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PEÑA, J.B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine **Aquat. Toxicol.** n. 65, p. 337-360, 2003.

QIN, J.G., DONG, P. Acute toxicity of trichlorfon to juvenile yabby *Cherax desctructor* (Clark) and selected zooplankton species **Aquacult. Res.** n. 35, p. 1104-1107, 2004.

RAHMAN, M.Z., HOSSAIN, Z., MOLLAH, M.F.A., AHMED, G.U. Effect of Diazinon 60 EC on *Anabas testudineus*, *Channa punctatus* and *Barbodes gonionotus* The ICLARM Quarterly v.25, n.2, p. 8-12, 2002.

RAHIMI, R., ABDOLLAHI, M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides **Pest. Biochem. Physiol.** n. 88, p. 151-121, 2007.

RAJAN. M.T., BANERJEE, T.K. Histopathological changes induced by acute toxicity of mercuric chloride on the epidermis of freshwater catfish – *Heteropneustes fossilis* (Bloch) **Ecotox. Environ. Saf.** v. 22, n.2, p. 139-152, 1991.

RAO J.V. Effects of monocrotophos and its analogs in acetylcholinesterase activity's inhibition and its pattern of recovery on euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* **Ecotoxicol. Environ. Saf.** n. 59, p. 217-222, 2004.

RAO, J.V. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus* **Comp. Biochem. Physiol.** Part C, n. 143-148, 2006a.

RAO, J.V. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos **Chem.** n. 65, p. 1814-1820, 2006b.

ROCHA, A.S. **Toxicidade aguda e subaguda do triclorfon em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1836)** Dissertação mestrado - TO Universidade Federal do Tocantins, Araguaína. 2009.

ROTTMAN, R.W., FRANCIS-FLOYD, R., DURBOROW, R. The role of stress in

- fish disease **Southern Regional Aquaculture Center SRAC publication** n. 474, 4 p., 1992.
- SAHA, S., KAVIRAJ, A. Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioration through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* **Chemosphere** n. 74, p. 1254-1259, 2009.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., FERNÁNDEZ, C., ANDREU, E. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion **Ecotox. Environm. Saf.** n.41, p. 168-175, 1998.
- SANCHO, E., FERNANDÉZ-VEGA, C., VILLARROEL, M.J., ANDREU-MOLINER, E., FERRANDO, M.D. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, n. 150, p. 25-32, 2009.
- SANTOS, V.M.R., DONNICI, C.L., DACOSTA, J.B.N., CAIXEIRO, J.M.R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais **Quim. Nova** v.30, n.1, p. 159-170, 2007.
- SCHLENK, D. Pesticide biotransformation in fish **Biochem. Mol. Biol. Fis.** v. 6, p. 171-190, 2005.
- SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, M., HONNEN, W., TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish **J. Aqua. Ecos. Stress Rec.** n. 6, p. 75-86, 1997.
- SEPICI-DINÇEL A., BENLI, A.Ç.K., SELVI, M., SARIKAYA, R., SAHIN, D., ÖZKUL, I.A., ERKOÇ, F. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations **Ecotox. Environ. Saf.** n.72, p. 1433-1439, 2009.
- SHEPHARD, K.L. **Functions for fish mucus.** Review in fish biology and fisheries. v. 4, p. 401-429, 1994.
- SHUGART, L.R., McCARTHY, J.F., HALBROOK R.S. Biological markers of environmental and ecological contamination **Risk Anal.** n.12, p. 353-360, 1992.
- SIA. **Sistema de informações sobre agrotóxicos.** Classe inseticida: Trichlorfon. CD. 2003.

- SINGH, N., SRIVASTAVA, A.K. Formothion induced hematological changes in the freshwater Indian catfish, *Heteropneustes fossilis* **J. Ecotoxicol. Environ. Monit.** n. 4, p. 137-140, 1994.
- SOGORB, M.A., VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis **Toxicol. Letters** n.128, p. 215-228, 2002.
- SOUZA, M.L.R., GANECO, L.N., NAKAGHI, L.S.O., FARIA, R.H.S., WAGNER, P.M., POVH, J.A., FERREIRA, I.C. Histologia da pele do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e testes de resistência do couro **Acta Sci. Animal Sci.** v.25, n.1, p. 37-44, 2003.
- SVOBODA, M., LUSKOVÁ, V., DRASTICHOVÁ, J., ZLÁBEK, V. The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.) **Acta Vet. Brno** n. 70, p. 457-465, 2001.
- TAKASHIMA, F., HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features.** 2ª edição, Kodansha Ltda, Tokio, 195p., 1995.
- TAVARES, D.M., MARTINES, M.L., NASCIMENTO, K.S. Evaluation of the hematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate **Rev. Bras. Zool.** n. 16, p. 5553-5555, 1999.
- TAVARES-DIAS, M., MARTINS, M.L., SCHALCH, S.H.C., ONAKA, E.M., QUINTANA, C.I.F., MORAES, J.R.E., MORAES, F.R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄) **Acta. Sci.** v.24, n.2, p. 547-554, 2002.
- THOMAZ, J.M., MARTINS, N.D., MONTEIRO, D.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®) **Ecotoxicol. Environ. Saf.** doi: 10.1016/j.econenv.2008.11.003, 2009.
- TIERNEY, K.B., BALDWIN, D.H., HARA, T.J., ROSS, P.S., SCHOLZ, N.L., KENNEDY, C.J. Olfactory toxicity in fishes **Aquat. Toxicol.** n.96, p. 2-26, 2010.
- TOMLIN, C.D.S. **The pesticide manual** British Crop Protection Council, Farnham,

2000.

TORRE, F.R., SALIBIÁN, A., FERRARI, L. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish **Chemos.** n. 68, p. 1582-1590, 2007.

URBINATI, E. C., CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura *in* CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva** São Paulo: TecArt, 2004. p. 171-194.

URBINATI, E.C., GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) *in* BALDISSEROTO, B., GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil** Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 225-246.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for the health: risk assessment guidance for superfund (RAGS)**. 2002. Disponível em: <www.epea.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7>. Acesso em:10/02/2004.

VARÓ, I., NAVARRO, J.C., AMAT, F., GUILHERMINO, L. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) **Pest. Biochem. and Physiol.** n. 75, p. 61-72, 2003.

VARÓ, I., AMAT, F., NAVARRO, J.C. Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species **Aquat. Toxicol.** n. 88, p. 53-61, 2008.

VEIGA, M.L., RODRIGUES, E.L., PACHECO, F.J., RANZANI-PAIVA, M.J.T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure **Braz. Arch. Biol. Tech.** v.45, n.2, p. 171-175, 2002.

VELMURUGAN, B., SELVAHAYAGAM, M., CENGIZ, E.I., UNLU, E. The effects of monocrotophos to different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** n.78, p. 450-454, 2007.

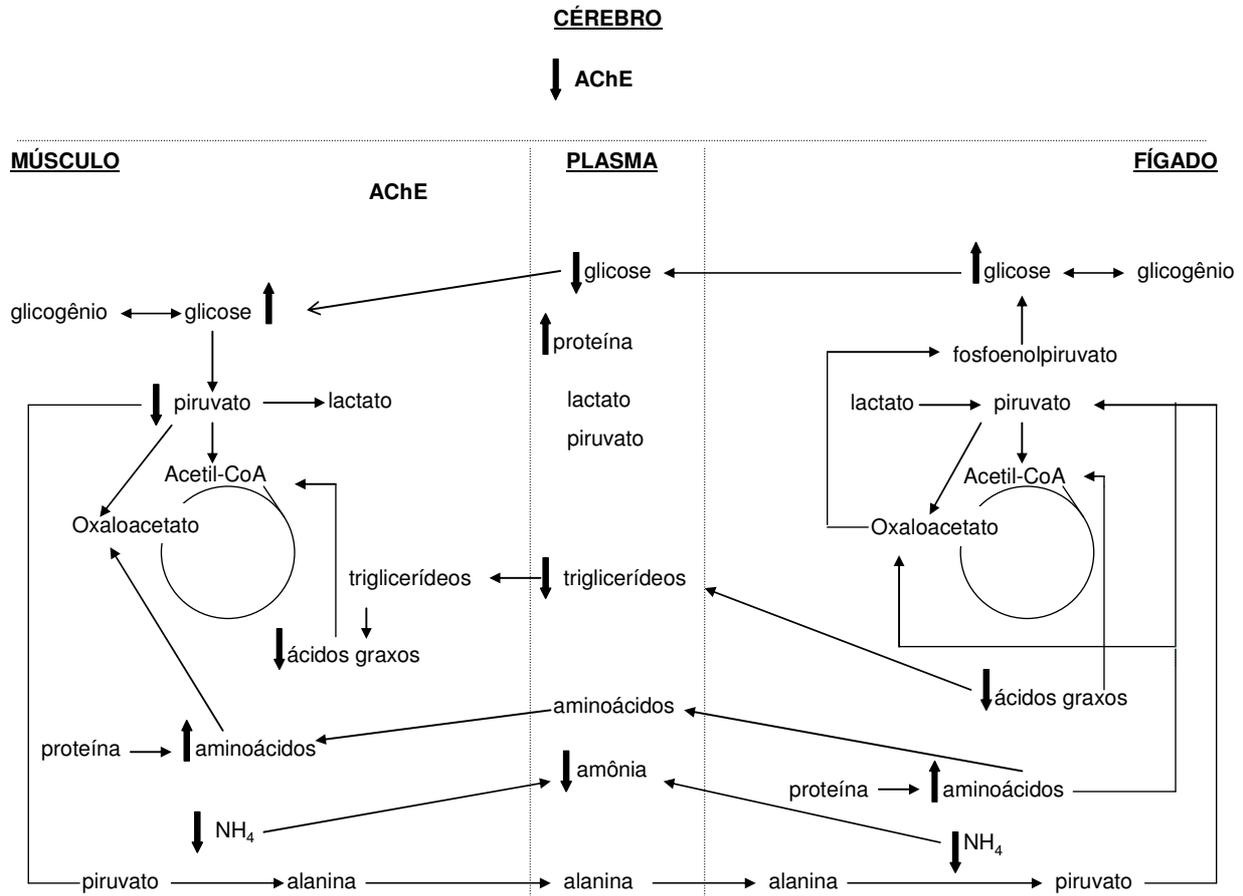
VIJAYAVEL, K., RANI, E.F., ANBUSELVAM, C., BALASUBRAMANIAN, M.P. Interactive effect of monocrotophos and ammonium chloride on the freshwater fish *Oreochromis mossambicus* with reference to lactate/pyruvate ratio **Pest. Biochem. Physiol.** n.86, p. 157-161, 2006.

YOSHIMURA, H., ENDOH, Y.S. Acute toxicity to freshwater organisms of

- antiparasitic drugs for veterinary use. **Environ. Toxicol.**, v.20 n.1, p.60-66, 2005.
- WALKER, C.H. Biochemical biomarkers in ecotoxicology - some recent developments **The Sci. Total Environ.** n.171, p. 189-195, 1995.
- WALSH, T.K., LYNDON, A.R., JAMIENSON, D.J. Identification of cDNAs induced by the organophosphate trichlorphon in the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda; Caligidae) **Pest. Biochem. and Physiol.** n. 88, p. 26-30, 2007.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish **Physiol. rev.** v. 77, n.3, p. 591-625, 1997.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The modulating effect of individual differences on the impact of multiple stressors on homeostasis **Comp. Biochem. Physiol. Part A** v. 151, n. 1, sup.1, p. S19, 2008.
- WESTER, P.W., VOS, J.G. Toxicological pathology in laboratory fish: an evaluation with two species and various environmental contaminants **Ecotox.** n.2, p. 21-44, 1994.
- ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. (org.). **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações** São Carlos: Rima, 2006. p. 39-53.
- ZHANG, X., XIE, P., LI, D., SHI, Z. Hematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms of anemia **Toxicon** n.49, p. 1150-1157, 2007.
- ZUCKER, E. Hazard evaluation division – Standard evaluation procedure – Acute toxicity test for freshwater fish. **USEPA publication** 540/9-85-006, 17p., 1985.

9. APÊNDICES

Apêndice A: Modelo do perfil metabólico de pacu após exposição sub-letal de triclofon por 96 horas.



Apêndice B: Modelo do perfil metabólico de pacu após recuperação por 7 dias.

