

GISELE CRISTIANE DE MELO

**“EFEITOS SUBLETAIS DA AÇÃO DO ORGANOFOSFORADO FOLIDOL® 600
NO FÍGADO DO PEIXE DE ÁGUA DOCE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (QUOY &
GAIMARD, 1824): UMA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA”**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Área Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a Edith Susana Elisabeth Fanta

CURITIBA

2004

Viste como ergueram aquele edifício de grandeza imponente? - Um tijolo, e outro. Milhares. Mas um a um.

- E sacos de cimento, um a um. E blocos de pedra, que pouco representam na mole do conjunto. - E pedaços de ferro. - E operários que trabalham, dia a dia, as mesmas horas. . .

Viste como levantaram aquele edifício de grandeza imponente?... À força de pequenas coisas!

(Josemaría Escrivá)

Dedico este trabalho:

Aos meus queridos pais VANADIR e SUELY, que coube a missão de guiar-me, para que os “espinhos” encontrados, no decurso da vida, fossem superados de forma a servirem de lições construtivas para meu engrandecimento. Sou grata e compartilharei sempre as minhas vitórias, pois elas serão fruto das suas colaborações.

Ao meu amado ISRAEL, que com sua dedicação e incentivo, tornou possível a realização deste estudo. Que acreditou em meus sonhos. Que compartilhou minhas alegrias e tristezas. Que com seu amor tornou minha vida verdadeiramente especial.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de render homenagem de agradecimento ao nosso Querido **Deus**, por ter concedido mais esta oportunidade de realizar um grande sonho! Sou grata, que no meio a tantas dificuldades, concedeu-me força e coragem para ir adiante.

À **toda minha família** eu agradeço pela paciência, compreensão e grande ajuda nos momentos difíceis!

Sou imensamente grata à minha orientadora **Dr^a Edith Fanta**, por me oferecer o seu Laboratório e me possibilitar esta grande oportunidade profissional, me deixando livre na escolha dos meus objetivos. Com você eu aprendi a crescer, intelectualmente e profissionalmente. Sou grata ainda pela sua imensa compreensão e amizade!

À uma pessoa muito especial, eu deixo o meu profundo agradecimento, **Dr^a Lucélia Donatti!** Pela valiosa orientação que me ofereceu na confecção deste trabalho e principalmente, por me fazer entender o significado da “Ciência”. Pela aquisição das imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Ainda sou imensamente grata pela sua inestimada amizade!

Ao professor **Mestre Paulo César Falanghe Carneiro** responsável pela piscicultura “Patronato Santo Antônio” da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e a **Daniel**, pela doação dos exemplares de Jundiá.

Ao cunhado **Samuel**, pela grande ajuda na impressão desta dissertação.

À Professora e **Mestre Ana Aparecida Nogueira Meyer**, pelo grande apoio que me ofereceu durante este curso.

Às professoras **Dr^a Hiroko Nitta** e à **Mestre Sílvia Romão** pela ajuda ao ingressar no Mestrado.

À Secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas: **Marlene B. de Camargo**, por ter me atendido em todos os momentos!

À amiga **Aymara**, pela maravilhosa amizade, compreensão nos momentos de ausência e auxílio nos momentos de dificuldade!

Às amigas **Cácia** e **Maritana** do curso de mestrado em Biologia Celular e Molecular da UFPR, pela amizade e ajuda durante o curso!

Aos amigos **Cácia** e **Wagner** do Laboratório de Impacto Ambiental, pela ajuda na dissecação dos peixes.

À todos os meus amigos do Laboratório de Impacto Ambiental: **Fabiola**, **Pedro**, **Kátia**, **Eloísa**, e à todos os demais amigos aqui encontrados.

Ao **Departamento de Zoologia**, por ter permitido o uso do Laboratório de Análise de Imagens.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica** da Universidade Federal do Paraná.

À **todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular**, por toda a contribuição na minha formação como mestre.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular**, pelo apoio financeiro em viagens de Congresso.

E à muitas outras pessoas que colaboraram com esta etapa tão valiosa da minha vida profissional, as quais, sem mesmo perceber, tornaram possível a realização deste trabalho!

À **todos vocês**, eu deixo o meu profundo agradecimento!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 TOXICIDADE DOS AGROTÓXICOS	2
1.2 OS ORGANOFOSFORADOS	4
1.2.1 Os Organofosforados em Ambientes Aquáticos.....	5
1.2.2 Biotransformação dos Compostos Organofosforados.....	7
1.2.3 Efeitos dos Compostos OPs em Células e Tecidos	8
1.2.4 Folidol® 600 - Composto Organofosforado em Estudo	15
1.3 CARACTERIZAÇÃO DO FÍGADO DE PEIXES TELEÓSTEOS.....	17
1.4 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	22
3.1.1 Aclimação Laboratorial de <i>Rhamdia quelen</i>	22
3.1.2 Determinação de uma Dose Subletal de Folidol® 600 para <i>Rhamdia quelen</i> ...	23
3.1.3 Testes de Toxicidade	24
3.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ULTRAESTRUTURAL.....	25
3.2.1 Fixação e Processamento para Microscopia de Luz das Amostras de Fígado de <i>Rhamdia quelen</i>	25
3.2.2 Fixação e Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão das Amostras de Fígado de <i>Rhamdia quelen</i>	26
3.2.3 Análise das Lâminas em Microscopia Óptica	27
3.2.4 Estatística.....	28
4 RESULTADOS	33
4.1 DETERMINAÇÃO DE UMA DOSE SUBLETAL DE FOLIDOL® 600 PARA <i>Rhamdia quelen</i>	33

4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> : ANIMAIS CONTROLE.....	34
4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTAMINADO COM FOLIDOL [®] 600	41
4.3.1 Tempo de Exposição 4 horas.....	41
4.3.2 Tempo de Exposição 24 horas.....	42
4.3.3 Tempo de Exposição 48 horas.....	42
4.3.4 Tempo de Exposição 72 horas.....	43
4.3.5 Tempo de Exposição 96 horas.....	43
4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM INDIVÍDUOS DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE	51
4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM INDIVÍDUOS DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTAMINADOS COM FOLIDOL [®] 600	52
4.5.1 Melano-macrófagos.....	52
4.5.2 Congestão Sanguínea.....	53
4.5.3 Hepatócitos com Pigmento Biliar.....	53
4.5.4 Densidade de Hepatócitos	54
4.5.5 Focos de Necrose	55
4.5.6 Degeneração Hidrópica.....	56
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	67
7 REFERÊNCIAS.....	68
8 ANEXOS	81
ANEXO I.....	82
ANEXO II.....	85
ANEXO III.....	86
ANEXO IV	93
ANEXO V	94
ANEXO VI	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Número de peixes mortos correspondente à concentração de Folidol [®] 600 administrada.....	33
TABELA 2 - Relação dose/animal de Paration metílico, principio ativo do Folidol [®] 600 administrado.....	85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema da biotransformação dos compostos organofosforados.....	8
FIGURA 2 - Esquema da ação do neurotransmissor acetilcolina (Ach).....	10
FIGURA 3 - Fórmula estrutural do princípio ativo Paration metílico.....	16
FIGURA 4 – INDIVÍDUOS DE <i>Rhamdia quelen</i> (JUNDIÁ)	29
FIGURA 5 – TESTES DE TOXICIDADE DE FOLIDOL [®] 600 PARA <i>Rhamdia quelen</i>	30
FIGURA 6 – DETERMINAÇÃO DA DOSE SUBLETAL DE FOLIDOL [®] 600 PARA <i>Rhamdia quelen</i>	31
FIGURA 7 – PRÁTICA METODOLÓGICA.....	32
FIGURA 8 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE	37
FIGURA 9 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE	38
FIGURA 10 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE	39

FIGURA 11 – ORGANIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTROLE.....	40
FIGURA 12 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTAMINADO COM FOLIDOL [®] 600. Tempo de exposição de 4 horas	45
FIGURA 13 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTAMINADO COM FOLIDOL [®] 600. Tempo de exposição de 24 horas	46
FIGURA 14 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTAMINADO COM FOLIDOL [®] 600. Tempo de exposição de 48 horas	47
FIGURA 15 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTAMINADO COM FOLIDOL [®] 600. Tempo de exposição de 72 horas	48
FIGURA 16 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTAMINADO COM FOLIDOL [®] 600. Tempo de exposição de 96 horas	49
FIGURA 17 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE <i>Rhamdia quelen</i> CONTAMINADO COM FOLIDOL [®] 600. Tempo de exposição de 96 horas	50
FIGURA 18 - Densidade de melano-macrófagos no fígado de indivíduos de <i>R. quelen</i> provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais.....	52
FIGURA 19 - Densidade de congestão sanguínea no fígado de indivíduos de <i>R. quelen</i> provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais.....	53
FIGURA 20 - Densidade de hepatócitos com pigmento biliar de indivíduos de <i>R. quelen</i> provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais.....	54
FIGURA 21 - Densidade de hepatócitos de indivíduos de <i>R. quelen</i> provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais	55

FIGURA 22 - Ocorrência de focos de necrose de indivíduos de *R. quelen* provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais 56

RESUMO

Folidol[®] 600 é um organofosforado (OP) extensamente utilizado na agricultura do estado do Paraná, sendo toxicologicamente classificado como extremamente tóxico. Este trabalho tem como objetivo verificar a histopatologia no fígado de juvenis de *Rhamdia quelen* (Jundiá) expostos a dose subletal de Folidol[®] 600, cujo princípio ativo é o Paration metílico. Foi verificado que a dose de 0,01 mL/L é subletal para a espécie no período de 96 horas. Esta dose foi utilizada para a contaminação dos peixes em ensaios agudos, visando a análise histopatológica desse OP no tecido hepático. Animais controle (n=5) e contaminados (n=10) foram sacrificados, após secção medular, nos tempos de 4 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de exposição ao poluente. O fígado foi processado para ser analisado através de microscopia de luz e de microscopia eletrônica de transmissão. O tecido hepático de *R. quelen* foi alvo da ação tóxica de Folidol[®] 600, sendo que as alterações tornam-se evidentes a partir de 4 horas de exposição. As alterações verificadas no fígado foram: diminuição na densidade de melano-macrófagos, focos de necrose, aumento na densidade de hepatócitos e de hepatócitos com pigmento biliar, perda do contorno celular dos hepatócitos, granulação citoplasmática, diminuição da vacuolização citoplasmática, rompimento mitocondrial, desestruturação do retículo endoplasmático rugoso, heterocromatização nuclear e descaracterização do endotélio. Focos de necrose foram encontrados em todos os tempos analisados, aumentando significativamente em relação à amostra controle nos tempos de 48 h e 72 h. O número de hepatócitos aumentou significativamente em todos os tempos experimentais em relação à amostra controle. O número de hepatócitos com pigmento biliar aumentou significativamente nas primeiras 72 horas em relação ao controle. A densidade de melano-macrófagos apresentou diferença significativa sendo que o tempo de 48 horas experimental diferiu dos tempos de 24 hs e 72 hs experimentais. Alterações histológicas hepáticas significativas foram observadas, o que sugere diminuição do metabolismo, e conseqüentemente prováveis danos à saúde dos juvenis de *R. quelen*.

ABSTRACT

Folidol[®] 600 is an organophosphate (OP) which is widely used in the agriculture of the state of Paraná, Brazil. It is toxicologically classified as extremely poisonous. This study has the aim of verifying the histopathology in the liver of *Rhamdia quelen* (Jundiá) juveniles that were exposed to a sublethal dose of Folidol[®] 600. This organophosphate has as its active principle the Methyl parathion. It was verified that the dose of 0,01 mL/L is sublethal to the species at an exposure time of 96 hours. This dose was used for contaminating the fishes in acute experiments for the histopathologic analysis of this OP in the hepatic tissue. Control animals (n=5) and contaminated animals (n=10) were sacrificed after a medullary section, at exposure times of 4, 24, 48, 72 and 96 h to the pollutant. The liver was processed for being analyzed through light microscopy and through transmission electronic microscopy. The hepatic tissue of the *R. quelen* was target for the toxicant action of Folidol[®] 600 and some alterations became evident after 4 hours of exposure. The alterations observed in the liver were the following: reduction in the density of melano-macrophages, focuses of necrosis, enhancement in the density of hepatocytes and of hepatocytes with biliary pigment, loss of the cellular contour of the hepatocytes, cytoplasmic granulation, reduction of the cytoplasmic vacuolization, mitochondrial disruption, disorganization of the rough endoplasmic reticulum, nuclear heterochromatization and decharacterization of the endothelium. Focuses of necrosis were found in every analyzed period and they increased significantly when compared to the control samples at times of 48 and 72 h. The number of hepatocytes increased significantly in every experimental period when compared to the control animals. The number of hepatocytes with biliary pigment increased significantly in the first 72 hours when compared to the control samples. The density of melano-macrophage presented significant difference because the experimental 48 hours time frame differed from the experimental 24 and 72 hours time frame. Significant hepatic histologic alterations were observed. These alterations could diminish the liver metabolism, and as a consequence, they could cause damages to the health of the *R. quelen* juveniles.

1 INTRODUÇÃO

O contínuo aumento da população humana exige uma crescente produção alimentar, levando à intensificação da agricultura (FELLENBERG, 1980). Com a utilização de modernas práticas agrícolas ocorreu um aumento na oferta de nutrientes e uma diminuição de predadores agrícolas. Estes fatores, dentre outros, intensificaram os problemas relacionados às pragas agrícolas (FELLENBERG, 1980; MURTY, 1986). A constante melhoria do rendimento agrícola não requer apenas o emprego adequado de fertilizantes, mas, exige também uma adequada proteção das plantas contra estes agentes (FELLENBERG, 1980).

Apesar da dependência existente entre industrialização, produção de alimentos, poluição e o crescimento demográfico, o comprometimento do meio ambiente por substâncias tóxicas não constitui problema recente (FELLENBERG, 1980). Grande número de estudos científicos vêm apontando uma série de problemas causados pelos agrotóxicos (ANEES, 1978; BADAWEY, 1998; BASTOS et al., 1998; FANTA, 1997; FANTA et al., 2003; GILL et al., 1990; LANGENBACH, 1999; MACHADO & FANTA 2003; RAMANESWARI & RAO, 2000; RICHMONDS & DUTTA, 1992; RODRIGUES & FANTA, 1998; SAMUEL & SASTRY, 1989; SANCHO et al., 1998; SANTHAKUMAR et al., 1999; SILVA et al., 1993; TSUDA et al., 1990; VARÓ et al., 2000).

As substâncias tóxicas deveriam controlar apenas as pragas que ameaçam a agricultura, mas na verdade afetam outras formas de vida (ASSELBORN, 2000; FANTA, 1997; FANTA et al., 2003; JONSSON, 1991; LONE & JAVAID, apud CABRINI, 1992; RODRIGUES & FANTA, 1998; SILVA et al., 1993). Podem, por exemplo, reduzir as populações de certas espécies da flora e da fauna, às vezes ameaçando-as de extinção. Tais alterações do equilíbrio ecológico levam, em certos casos, ao aumento da população de espécies que seriam predadas pelas pragas que foram eliminadas, gerando um efeito prejudicial (LANGENBACH, 1999).

As estatísticas têm mostrado que, apesar do emprego maciço dos agrotóxicos, a ocorrência de pragas no planeta aumentou de modo significativo. Com isso, os prejuízos recaem sobre os produtores, pelo aumento dos custos agrícolas, e sobre os ecossistemas, em função da degradação ambiental

generalizada (BULL & HATHAWAY, 1986; LANGENBACH, 1999; LARA, 1986; MARICONI et al., 1985).

Segundo ZAMBRONE (1986), as principais substâncias químicas utilizadas na agropecuária, são os pesticidas. A designação já inaugura polêmica: ecologistas e defensores do meio ambiente utilizam o termo “agrotóxicos” enquanto as indústrias produtoras usam a expressão “defensivos agrícolas”. Os agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas e biocidas são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, destinadas a matar, controlar ou combater de algum modo as pragas (LARINI, 1999; ZAMBRONE, 1986). De acordo com estes autores, o termo “praga” aplica-se aos organismos, animais ou vegetais, capazes de reduzir a quantidade de alimento ou prejudicar a qualidade do mesmo e de seus produtos durante as diferentes etapas da produção agrícola. No sentido mais amplo, pragas são organismos que atacam, lesam ou transmitem enfermidade às plantas, aos animais e ao homem. Assim, o termo “praguicida”, inclui apenas aqueles compostos químicos capazes de matar as pragas, excluindo da terminologia aqueles compostos que atraem, repelem ou que regulam o crescimento e a reprodução dos organismos vivos.

1.1 TOXICIDADE DOS AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos são compostos químicos benéficos, na medida em que protegem contra perdas florestais e agrícolas e podem auxiliar na produção mais eficiente de alimentos. Contudo, os benefícios dos pesticidas têm um preço. As desvantagens consistem na sua toxicidade para humanos e animais, e plantas, e também a sua persistência no ambiente (AGUIAR et al., 2002; LANGENBACH, 1999).

Os agrotóxicos são, hoje, causadores de polêmicas. Essas substâncias, não apresentam especificidade para determinada praga. Assim, raticidas não matam só ratos, mas muitos outros animais. Os inseticidas, além dos insetos nocivos, eliminam insetos úteis e outros invertebrados, além de peixes, animais silvestres e domésticos e até o homem. Muitos são extremamente tóxicos, bastando poucas gotas para matar um indivíduo adulto. Outros, além de tóxicos, são poluidores do ambiente (PASCHOAL, 1979; ZAMBRONE, 1986; PAWLOWSKY, 1994).

Alguns deles acabam deixando resíduos nos alimentos, como por exemplo, em algumas frutas e verduras. Muitas vezes, porém, o sistema de saúde não identifica a origem das doenças provocadas por este tipo de contaminação, o que dificulta a avaliação dos prejuízos. Entre junho de 2001 e junho de 2002, especialistas examinaram 1295 amostras de nove alimentos, que foram recolhidas em supermercados de algumas capitais brasileiras. O resultado apontou o morango como o mais contaminado, com 46% das amostras apresentando resíduos de agrotóxicos. Em seguida vieram o tomate, com 26,1%, a batata com 22,2%, o mamão com 19,5%, a alface com 8,64%, a banana com 6,53%, a maçã com 4,04% e a laranja com 1,41%. Segundo o toxicologista Igor Vassilieff, de Botucatu, no interior paulista, o agricultor brasileiro não respeita as normas de uso dos pesticidas e muitas vezes mal as conhece. “Ele lê a quantidade recomendada na embalagem e pensa ‘Só isso?’”. Outro problema que passa despercebido é o intervalo de segurança, ou seja, o período específico que cada veneno tem para se dissolver antes da colheita do alimento. O carbofurano usado na batata, por exemplo, deve ser aplicado com 60 dias de antecedência. Porém, nem sempre é assim (CORRADINI, 2003).

Infelizmente, os agrotóxicos liberados também ameaçam a nossa saúde se forem ingeridos em grande quantidade, através dos alimentos, causando câncer e alterações embrionárias. Alguns desses compostos permanecem na casca, enquanto os chamados sistêmicos, entram na seiva da planta e se alojam na polpa ou nos vasos lenhosos. A recomendação sugerida para eliminar os resíduos de superfície em até 80%, é a utilização do bicarbonato de sódio, deixando os vegetais de molho por até meia hora em uma solução de 1 colher de sopa do pó para cada litro de água. Em seguida é necessário que sejam lavados em água corrente. Entretanto, essa recomendação não é funcional para os sistêmicos. A explicação do uso do bicarbonato, é que os agrotóxicos não resistem ao pH do bicarbonato de sódio (CORRADINI, 2003).

O mesmo vale para quem aplica esses produtos nas lavouras, sobretudo quando feita manualmente por pequenos produtores, expondo o trabalhador rural à contaminação em altas doses. Isso é confirmado pelo grande número de intoxicações agudas e danos crônicos à saúde registrada no Brasil. Um trabalho com plantadores de tomate realizado pela Universidade Estadual Paulista, em Botucatu,

mostrou que a produção de espermatozoides sadios caiu em 50% nesses homens e se suspeita que a observada redução da fertilidade masculina decorra da ingestão diária de uma associação de diferentes agrotóxicos, mesmo em baixas concentrações (CORRADINI, 2003; LANGENBACH, 1999).

Os agrotóxicos exercem sua ação mediante mecanismos distintos, tais como, modificação do equilíbrio ácido-base, alteração da permeabilidade das membranas celulares, produção de floculações e coagulação do protoplasma celular, inibição de enzimas respiratórias, produção de disfunção hormonal, indução microssomais, produção de lesões do DNA, alteração do equilíbrio eletrolítico, e alteração de tecidos e funções metabólicas (FANTA, 1997; FANTA et al., 2003; JONSSON, 1991; KUMAR & ANSARI, 1986; MACHADO & FANTA, 2003; MALLATT, 1985; RODRIGUES & FANTA, 1998; SAMPAIO & GUERRA, 1988; SILVA et al., 1993).

1.2 OS ORGANOFOSFORADOS

Quimicamente, os agrotóxicos podem ser classificados em Organofosforados ou Fosforados Orgânicos (OP), Organoclorados (OC), Carbamatos e Piretrinas (naturais e sintéticas). Após a Segunda Guerra Mundial, ocorreu o uso extensivo de compostos OC, responsáveis por diversos distúrbios ambientais. Em 1950, outro grupo de pesticidas, os compostos OP, ganhou importância. Subseqüentemente, os carbamatos e as piretrinas foram também introduzidos (CALDAS, 2003; LARINI, 1999; MURTY, 1986).

Os compostos OP sintéticos são utilizados para diversas finalidades na agropecuária (LARINI, 1999) e até como gás de guerra. Este foi desenvolvido com o nome de Schradan, por SCHRADER (MACHADO, 1995), em plena Segunda Guerra Mundial. Após a guerra, a indústria química, teve grande desenvolvimento e, com ela, o desenvolvimento dos inseticidas sintéticos. Hoje, no Brasil, na forma de mais de 300 princípios ativos e mais de 4.000 produtos comerciais, os agrotóxicos têm utilização cada vez mais ampla, tanto na agricultura como na saúde pública e, sem dúvida, já se incorporaram ao dia-a-dia da população em geral (FONSECA, 2002; ZAMBRONE, 1986).

Os OPs e os carbamatos são os agrotóxicos atualmente mais utilizados (ZAMBRONE, 1986). Os primeiros são mais biodegradáveis e menos persistente no

meio ambiente do que os OCs, tendo sido desenvolvidos para substituir os OCs (MACHADO & FANTA, 2003). Segundo WARE (1991), os OPs estão entre os agrotóxicos que apresentam toxicidade para vertebrados. Podem causar intoxicações agudas graves, sendo os responsáveis por um grande número de óbitos. Tal fato poderia ser atribuído, em parte, à sua pequena margem de segurança, ou seja, pequena dose necessária para produzir uma intoxicação grave sem que haja um sinal ou sintoma mais evidente (ZAMBRONE, 1986).

Para o desenvolvimento de agentes capazes de proteger as plantações do ataque de pragas, alguns fatores devem ser considerados, como a efetividade, a ação nociva no ambiente, a toxicidade e o custo. Os OPs constituem uma classe de compostos que atende bem a tais quesitos (ETO, 1974). Modificações químicas pequenas de um composto OP freqüentemente causam uma diferença na toxicidade para as diferentes espécies. Assim, compostos que são quimicamente muito similares, são freqüentemente usados para finalidades diversas (ETO, 1987).

Os OPs podem ser derivados dos ácidos fosfórico, tionofosfórico, ditionofosfórico, pirofosfórico ou ditionopirofosfórico (LARINI, 1987; OGA, 1996). Podem ser divididos em OPs não sistêmicos e OPs sistêmicos. Os OPs não sistêmicos geram a morte de várias espécies de insetos apresentando uma grande perturbação no equilíbrio biológico. Já os sistêmicos são assim chamados por serem seletivos, agindo somente contra uma espécie alvo (MARICONI, 1958).

Os OPs não sistêmicos e os sistêmicos são ésteres fosfóricos, cujas propriedades inseticidas foram evidenciadas a partir de 1937 por SCHRADER, na Alemanha, com a síntese do Tabun e do Sarin. O mesmo pesquisador estudou o OMPA (octametilpirofosforamida) em 1941, o TEPP (tetraetilpirofosfato) em 1943 e o Paration etílico em 1944 (MACHADO, 1995).

1.2.1 Os Organofosforados em Ambientes Aquáticos

A poluição das águas se processa em ritmo intenso, devido ao grande número de compostos nocivos lançados nos ecossistemas aquáticos (FELLENBERG, 1980). A contaminação das águas pelos agrotóxicos deve-se, dentre outros, ao emprego dos mesmos na forma de aerossóis ou hidrossóis, pelo despejo de restos de soluções de praguicidas, pela limpeza dos recipientes e

utensílios utilizados na aplicação, pela remoção dos agrotóxicos do solo por ação da chuva e ao arrasto de substâncias tóxicas a rios e lagos pelas águas pluviais, e por contaminação dos lençóis freáticos (FELLENBERG, 1980; LANGENBACH, 1999).

Quando um praguicida entra no meio aquático, ele pode volatilizar, permanecer dissolvido na água, manter-se em suspensão como microcristais, ser adsorvido nas partículas suspensas na água, ser depositado nos sedimentos ou acumular-se nos seres vivos. Portanto, no meio aquático, os resíduos de agrotóxicos podem ocorrer na água, no plâncton, na matéria suspensa, nos peixes, noutros animais e nas plantas (PAWLOWSKY, 1994).

Nos ambientes aquáticos, a absorção das substâncias tóxicas por algas, leva, através da cadeia alimentar, ao aumento das concentrações nos organismos pertencentes aos níveis tróficos superiores, fenômeno conhecido como biomagnificação (MURTY, 1986; LANGENBACH, 1999). Assim, os OPs atingem um número elevado de organismos não-alvo, entre os quais estão os peixes (FANTA, 1997; FANTA et al., 2003; JONSSON, 1991; KUMAR & ANSARI, 1986; LARA, 1986; LONE & JAVAID, apud CABRINI, 1992; MACHADO & FANTA, 2003; RODRIGUES & FANTA, 1998; SILVA et al., 1993).

Os peixes podem ser “indicadores” apropriados para a comprovação da presença de agrotóxicos em águas interiores e marinhas (FELLENBERG, 1980; LANGENBACH, 1999). Inúmeros trabalhos têm demonstrado, através de análises químicas, a presença de resíduos de pesticidas na água, no sedimento, na microfauna e nos peixes (FANTA, 1997; JONSSON, 1991; LARA, 1986).

Devido a falta de investigações adequadas há uma tendência a assumir que a presença de compostos OPs tem menor conseqüência nos sistemas aquáticos (ASSELBORN et al., 2000). Em uma revisão dos efeitos dos agrotóxicos na vida aquática, HOFFMANN (1960) salienta que alguns organofosforados são altamente tóxicos para certas espécies de peixes.

Os peixes são importantes recursos vivos, seja por seu potencial comercial, seja pelo seu papel ecológico. Vários trabalhos fazem uso destes vertebrados para avaliar os efeitos tóxicos de organofosforados, organoclorados, carbamatos e outros compostos neurotóxicos na biota, tanto em ambientes dulcícolas quanto marinhos. AGUIAR et al. (2004) e SAMUEL & SASTRY (1989), encontraram alterações nos níveis de alguns parâmetros enzimáticos e bioquímicos do sangue, fígado, músculo

e cérebro em estudo com OP. RICHMONDS & DUTTA (1992), observaram aumento da proteína globulina e decréscimo da proteína albumina no soro de organismos expostos a OP. Diversos autores observaram inibição da atividade colinesterásica plasmática e cerebral e mudanças comportamentais na motilidade e na perda do equilíbrio (AGUIAR *et al.*, 2004; BASTOS *et al.*, 1998; CAVERO, 1985; CAVERO *et al.*, 1976; FONSECA, 2002; JOKANOVIĆ, 2001; LANGENBACH, 1999; OGA, 1996; PAYNE *et al.*, 1996; ROEX *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 1993; SILVA FILHO, 2000; STURM *et al.*, 1999; THANGNIPON *et al.*, 1995). Alguns autores encontraram alterações morfológicas nas células hepáticas, branquiais e intestinais de peixes expostos a OP (FANTA *et al.*, 2003; GUIMARÃES, 2000; MACHADO & FANTA, 2003; RODRIGUES & FANTA, 1998). MAZON & FERNANDES (1999), observaram alta acumulação de cobre no fígado, intestino, rim e brânquias. RAMANESWARI & RAO (2000), identificaram altos níveis de OP e Endosulfan bioacumulados e bioconcentrados no organismo de diferentes espécies. SANTHAKUMAR *et al.* (1999), observaram alterações nas hemácias sanguíneas durante exposição com OP. VARÓ *et al.* (2000), determinaram diferentes graus de sensibilidade de diferentes espécies expostas a OP.

1.2.2 Biotransformação dos Compostos Organofosforados

Após a absorção pelo organismo, os compostos OPs (OPC) passam por muitas reações de biotransformação e não são armazenados no tecido adiposo como os OCs. Quase sempre os OPs são substâncias lipofílicas facilitando a penetração através da cutícula do inseto. As reações de biotransformação têm a função de tornar as moléculas mais polares e hidrossolúveis e, conseqüentemente, mais facilmente elimináveis.

As reações envolvidas na biotransformação alteram grandemente a toxicidade dessa classe de compostos. Assim, a maioria dos OPs, em condição pura, não metabolizada, não inibe a acetilcolinesterase (AChE) ou exibe um potencial inibitório muito baixo. No entanto, a inibição da AChE é grande quando são ativados pela biotransformação (JOKANOVIC, 2001; MACHADO & FANTA 2003; SALGADO & FERNÍCOLA, 1989). Dentro de condições *in vivo*, o potencial anticolinesterásico dos OPs pode ser aumentado grandemente, e o resultado dos

efeitos tóxicos representam a soma de processos bioquímicos de ativação e de detoxicação. A ativação de OPC pode ser definida como a transformação metabólica de OPC ativos para outros compostos ativos. Detoxicação de OPC inclui a biotransformação deles para metabólitos não-tóxicos. Detoxicação ou degradação é a reação mais significativa no metabolismo dos compostos OPs no corpo, e a ativação em si finalmente resulta em detoxicação. A biotransformação de OPC pode produzir muitos metabólitos tóxicos. Mesmo que a soma dos metabólitos formados nessas reações é baixa, isso pode ser muito significativo quando analisamos o aspecto toxicológico (JOKANOVIC, 2001).

A biotransformação é o resultado de uma conversão metabólica, na qual o grupo P=S é convertido em P=O, processada no retículo endoplasmático dos hepatócitos. O composto formado leva a terminação oxon. No caso do Paration metílico, forma-se o Metil Paraoxon, que é responsável por causar sérias alterações morfológicas no tecido hepático de peixes (ANEES, 1978; DUTTA *et al.* 1993; FANTA *et al.*, 2003; GILL *et al.*, 1988; RODRIGUES & FANTA 1998; RODRIGUES *et al.* 2001; SILVA, 1989; SILVA *et al.* 1993).

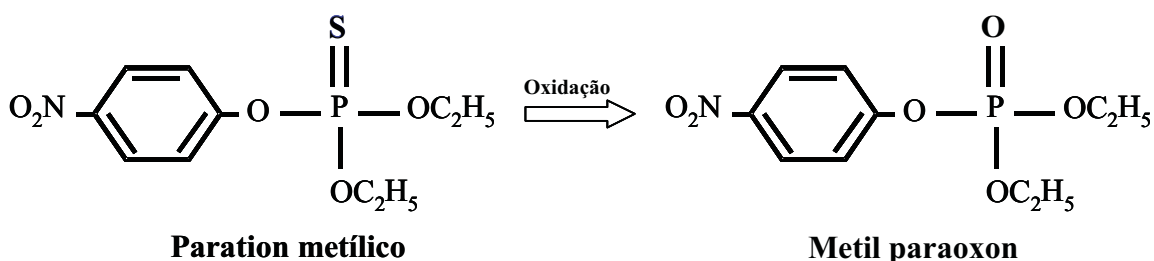


FIGURA 1 - Esquema da biotransformação dos compostos organofosforados.

1.2.3 Efeitos dos Compostos OPs em Células e Tecidos

Investigações indicaram que, em geral, os compostos organofosforados (OP) são menos tóxicos que os clorados (OCs) (ANON, 1959). Os OPs são mais tóxicos em termos de toxicidade aguda, porém eles são mais rapidamente biodegradáveis, não são persistentes na natureza e são mais solúveis em água que os OCs (KUMAR & ANSARI, 1986; ASSELBORN *et al.* 2000; MURTY, 1986).

Quase sempre a toxicidade dos produtos OPs é avaliada com base na dose letal 50% (DL₅₀). Esse critério é insuficiente, pois só informa a toxicidade aguda da substância química sobre determinada espécie animal, deixando de indicar possíveis alterações que possam decorrer da exposição mais prolongada a ela, com a absorção continuada de pequenas doses. Tampouco fornece informações sobre riscos de lesão em órgãos específicos ou sobre possíveis efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos, neurotóxicos e comportamentais. De fato, ainda se conhece muito pouco sobre a real toxicidade dessas substâncias (ZAMBRONE, 1986).

Os OPs penetram no organismo animal através das vias dérmica, respiratórias e oral. Circulam no sangue distribuindo-se pelo sistema nervoso central, rim, baço e fígado, local em que pode ocorrer a biotransformação do princípio ativo (CAVERO, 1985; CAVERO et al., 1976; PACHECO & SANTOS, 2002). Podem ser eliminados pela bile ou pela urina. Alguns são transportados até as glândulas mamárias e são secretados pelo leite (CAVERO et al., 1976; CAVERO, 1985; BRITO FILHO, 1988).

Os OPs, dentre eles o Paration metílico, podem causar graves transtornos nos sistemas nervoso e respiratório dos seres humanos, mamíferos e outros vertebrados, provocando alterações comportamentais e até a morte (FANTA et al., 2003; FONSECA, 2002; JOKANOVIĆ, 2001; SILVA et al., 1993). Os princípios ativos fosforados agem como inibidores de várias enzimas tais como as colinesterases (especificamente as acetilcolinesterases), as carboxilases, e as fosforilases oxidativas mitocondriais. A inibição da acetilcolinesterase é o efeito mais crítico, fazendo desta enzima um alvo para OPC ou derivados ativos deles (oxons), pois resultam no acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, interrompendo a transmissão neural (AGUIAR, et al., 2000; CAVERO, 1985; CAVERO et al., 1976; FONSECA, 2002; JOKANOVIĆ, 2001; OGA, 1996; SALGADO & FERNÍCOLA, 1989; SILVA et al., 1993; SILVA FILHO, 2000).

A AChE presente nas sinapses colinérgicas e nas placas motoras é o alvo de pesticidas organofosforados e carbamatos, fazendo desta enzima um potencial biomarcador de poluição (SILVA FILHO et al., 2000; PAYNE et al., 1996). Os fosforados unem-se irreversivelmente às moléculas de acetilcolinesterase, iniciando a inibição da enzima, gerando quadros de intoxicação aguda ou crônica,

dependendo do tipo de exposição à substância (CAVERO, 1985; CAVERO et al., 1976; FONSECA, 2002).

A função da acetilcolinesterase é a de controlar a elaboração de acetilcolina (ACh) pelo organismo no tecido nervoso. Em condições normais, a ACh, após exercer sua ação, é hidrolisada em ácido acético e colina pela AChE. Estes produtos são recapturados na sinapse e reutilizados na síntese de novas moléculas de ACh (CAVERO, 1985; CAVERO et al., 1976; SALGADO & FERNÍCOLA, 1989).

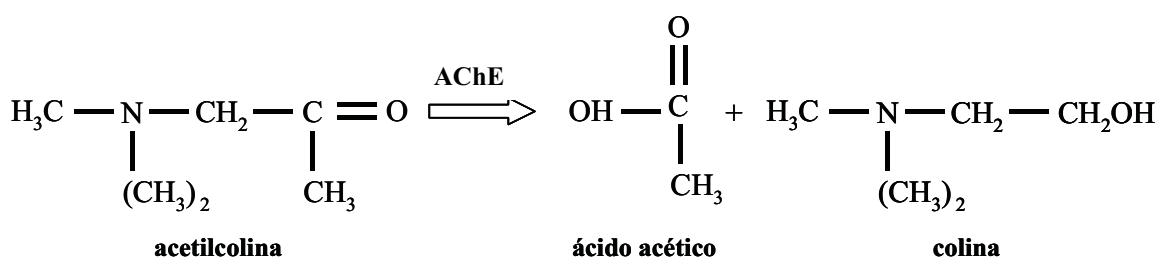


FIGURA 2 - Esquema da ação do neurotransmissor acetilcolina (ACh).

A acetilcolina tem a propriedade de excitar o sistema nervoso parassimpático e simpático e, somente pela sua presença, se dá a transmissão nervosa dos impulsos. A acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase quase que imediatamente, o que permite às sinapses transmitirem novamente o impulso. Desta forma, quando há inibição da acetilcolinesterase, há acúmulo de acetilcolina, provocando hiperexcitação do sistema nervoso (OGA, 1996; SALGADO & FERNÍCOLA, 1989).

Uma molécula de acetilcolinesterase é capaz de degradar trezentas mil moléculas de acetilcolina por minuto (FONSECA, 2002). Sua inibição resulta no acúmulo desse neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central, nas junções neuromusculares, nas terminações nervosas parassimpáticas e em algumas das simpáticas, como as glândulas sudoríparas (CAVERO et al., 1976; FONSECA, 2002).

MORAES (2003), estudou os efeitos metabólicos de diferentes concentrações do OP Paration metílico (Folidol[®] 600) no peixe tropical e nativo da região Amazônica, *Brycon cephalus* (matrinxã), num período de 4 horas. Foi observado que peixes expostos a baixas concentrações de Folidol exibiram aumento nos valores do

hematócrito e alta concentração de hemoglobina. O grupo exposto a concentrações altas de Folidol[®] 600 apresentou diminuição no número de eritrócitos. Os conteúdos de piruvato plasmático foram altos nos grupos expostos ao Folidol comparados aos grupos controles, já os conteúdos de piruvato no músculo diminuíram nos grupos expostos ao Folidol quando comparados aos grupos controles. Os valores de glicogênio do músculo e do fígado em grupos expostos foram significativamente mais baixos do que valores controles.

Em estudos com o OP Paration metílico, comparando várias espécies de peixes, verificou-se alguns sintomas comuns a todas as espécies. Entretanto, existem diferenças específicas quanto à sensibilidade, à velocidade de reação, à capacidade de recuperação e a via de acesso do poluente ao peixe (FANTA et al., 2003). Segundo SILVA (1989) e SILVA et al. (1993), 96 horas após administração do organofosforado Folidol[®] 600 por via intra peritoneal, no peixe *Callichthys callichthys*, observou-se necrose focal, degeneração nuclear no fígado e necrose no epitélio tubular renal. Após 120 horas, nos túbulos contorcidos proximais as lesões se mantiveram, sendo observadas, ainda, degeneração nuclear, vacuolização celular e intensa necrose focal, bem como acentuada redução do glicogênio hepático, degeneração e necrose do epitélio tubular renal.

RODRIGUES & FANTA (1998) estudando as alterações morfológicas em hepatócitos de *Brachydanio rerio* exposto à ação do OP Dimetoato 500 em dose subletal de 96 horas, concluíram que as alterações hepáticas tornam-se evidentes a partir de 2 horas de exposição. O contorno celular tornou-se indistinguível, alguns núcleos tornaram-se laterais e em degeneração, mostrando a forma e o tamanho variável, assim como diversos graus de heterocromatização. As células mostraram-se inchadas e, como consequência do aumento desse efeito, sinusóides e canálculos mostraram-se escassos. Alta vacuolização citoplasmática foi observada em alguns hepatócitos em diferentes áreas do fígado, já em outras áreas uma alta densidade de grânulos. Alguns núcleos extremamente picnóticos, progrediram a cariólise, levando à necrose e citólise focal. Regiões necróticas e hemorrágicas intensas também foram observadas.

RODRIGUES et al. (2001) avaliaram as alterações histopatológicas de fígados de juvenis de curimatá, *Prochilodus lineatus*, expostos a uma concentração subletal de 0,2 µ/L do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) por 48 horas.

Foram registrados hepatócitos com vacuolização, granulação citoplasmática, lateralização nuclear, núcleos com vários diâmetros e densidades, cromatina condensada na região central com picnoses, desorganização celular e áreas de necroses. Alterações semelhantes foram encontradas também para *Corydoras paleatus* contaminados experimentalmente com doses subletais de Folidol® 600 (FANTA et al., 2003).

FANTA et al. (2003), analisaram e compararam os efeitos histopatológicos do OP Folidol® 600 no intestino de *C. paleatus* cuja contaminação foi realizada via água e via trófica, em 96 horas com dose subletal. Os efeitos no epitélio intestinal foram significativamente mais altos em 4 horas após contaminação via trófica do que contaminação via água. A proporção de células caliciformes em relação aos enterócitos nos intestinos foi a mesma nos peixes contaminados pelas duas vias, mas a proporção de células caliciformes ativas foi significativamente mais alta nos peixes contaminados via alimento do que via água. Foi observado que os peixes contaminados via trófica pararam de se alimentar de 8 a 72 horas após contaminação, mas aqueles que foram mantidos na contaminação via água continuaram se alimentando normalmente durante o experimento.

DUTTA et al. (1993) observou mudanças histopatológicas no tamanho dos hepatócitos do peixe de água doce *Heteropneustes fossilis*, causada pela exposição aguda de 96 horas a uma dose subletal do inseticida organofosforado Malation. Nas primeiras 48 horas de exposição, o diâmetro médio da célula hepática diminuiu significativamente quando comparado com células controle. Houve nas primeiras 96 horas de exposição degeneração da membrana celular, vacuolização do citoplasma, núcleo picnótico e excêntrico. Os hepatócitos perderam a forma poligonal típica. A membrana celular mostrou rupturas entre duas ou mais células exibindo áreas severas com células binucleada ou multinucleada. Algumas células tornaram-se necróticas, outras extensivamente dilatadas, havendo completa extrusão do núcleo. Hemorragia e alargamento dos sinusóides sanguíneos também foram observados.

Tanto *Anguilla anguilla*, expostos a uma concentração subletal do OP Fenitrothion por 96 horas (SANCHO et al., 1998), quanto *Ophiocephalus punctatus*, expostos ao OP Diazinon (SASTRY & SHARMA, 1981), exibiram um aumento nos níveis de glicose sanguínea. Já FERRANDO et al. (1989), também observaram este

fenômeno, após exposição ao OP Lindane em *Anguilla anguilla* por 96 horas, além de um decréscimo no glicogênio hepático e muscular.

RAO & RAO (1984) investigaram os efeitos do organofosforado Paration metílico na síntese de derivados lipídicos, nos tecidos muscular, branquial, hepático e cerebral de peixes. Suas análises quantitativas registraram decréscimo de lipídios totais e fosfolipídios, e acréscimo de ácidos graxos livres e colesterol total em todos os tecidos dos peixes expostos a 0,09 ppm, por 48 horas (dose subletal). Os autores sugerem, com estes resultados, que houve maior requisição de energia pelos peixes nesta condição.

SANCHO et al. (1998), estudando o metabolismo energético do fígado no peixe *Anguilla anguilla* após 96 horas de exposição ao OP Fenitrothion na dose de 0,04 mg/L, observou que os níveis de lipídios totais diminuíram significativamente (80%) após 32 horas de tratamento com o OP. Num segundo experimento, os animais previamente expostos ao Fenitrothion por 96 horas, foram então transferidos para água limpa (período de recuperação) sem o contaminante por 102 horas. A análise de lipídios totais desse experimento mostrou que esses animais recuperaram o conteúdo lipídico do fígado.

O peixe de água doce *Puntius conchonius* exposto à dose subletal do OP Fosfamídol, apresentou hiperglicemia acompanhada de marcante hiperlactemia, além da exaustão do depósito de glicogênio cerebral e em alguma extensão no fígado (GILL et al., 1990).

Observações histológicas de SANTHAKUMAR et al. (1999), revelaram mudanças distróficas progressivas nos túbulos renais do peixe *Anabas testudines* exposto à dose subletal do OP Monocrotofós por um período de 7, 14 e 21 dias.

ANEES (1978), analisando os efeitos de três organofosforados, Diazinon, Paration metílico e Dimetoato no fígado do peixe de água doce *Channa punctatus* exposto em níveis subletais e crônicos, concluiu que o início e a severidade das lesões não demonstraram um padrão definido. Peixes tratados com Diazinon apresentaram vacuolização hepática dentro de 24 horas de exposição. Já, peixes tratados com Dimetoato e com Paration metílico o mesmo efeito apareceu após 96 horas e 14 dias de exposição, respectivamente. Dimetoato, conhecido como o menos tóxico dos organofosforados testado contra *C. punctatus* apresentou poucos

efeitos dentro de uma exposição prolongada. No entanto, em 24 horas de exposição, não ocorreu alto grau de granulação citoplasmática.

Comparando-se impactos tóxicos de exposição subletal do metal pesado, cloreto de cádmio, e o organofosforado Metacide-50, cujo ingrediente ativo é o Paration metílico, no decréscimo de reservas orgânicas gonadal (proteína, RNA, DNA, lipídio), na acumulação gonadal dessas substâncias e na depleção do Índice Somático Gonadal (ISG) em consideração ao controle foi determinado no estágio de desova de *Cirrhinus mrigala*. A diminuição percentual mais significativa de proteína ovariana tanto quanto, testicular, RNA, DNA, e conteúdos lipídicos, sobre os controles, foi observada após 22 dias de exposição crônica ao cloreto de cádmio. Após o tratamento com Metacide-50, o mesmo foi observado em 15 dias de exposição crônica. A proporção e a alta acumulação de resíduos de cádmio e Paration metílico, ocorreram após 22 e 15 dias de exposição crônica subletal do cloreto de cádmio e do Metacide-50, respectivamente. A alta proporção de acumulações testiculares de resíduos de cádmio e Paration metílico foram observadas após 22 e 15 dias de exposição ao cloreto de cádmio e ao Metacide-50, respectivamente. A diminuição percentual mais significativa do valor percentual do ISG, sobre o controle, de peixes testes tanto machos quanto fêmeas, após 30 dias de exposição ao cloreto de cádmio foi observado sendo 43,38 e 44,38%, respectivamente. Após 30 dias de exposição ao Metacide-50, o mesmo foi observado sendo 39,89 e 39,84%, respectivamente (ANAM, 1998).

MACHADO & FANTA (2003), investigaram os efeitos de um composto organofosforado, o Paration metílico, em brânquias de *Metynnis roosevelti* expostos a doses letais (7 ppm) e subletais (1 ppm) de Mentox 600 CE. Observações em microscopia de luz e eletrônica de varredura evidenciaram enrugamento do epitélio branquial, seguido por descolamento e hiperplasia. Externamente, os filamentos branquiais apresentaram desaparecimento gradual das microssaliências. Os resultados mostram que, mesmo em doses subletais, o organofosforado poderá levar o animal a sofrer conseqüências secundárias decorrentes das alterações da superfície de trocas gasosas e iônicas. Diante disso, os autores concluíram que *M. roosevelti* é mais sensível ao organofosforado Paration metílico do que *Brachydanio rerio* exposto à dose de 0,025 µL/L do OP Dimetoato 500 em 96 horas, uma espécie utilizada como padrão em testes de toxicidade.

GUIMARÃES (2000), estudando os efeitos do uso do organofosforado Trichlorfon contra parasitoses em piscicultura, analisou a morfologia das lamelas branquiais em peixes e verificou alterações a partir de 4 horas de exposição a uma dose de 0,25 ppm. As lamelas secundárias apresentaram edemas, grande proliferação celular, perda da forma e focos de fusão lamelar. Todas estas alterações foram observadas em conjunto e de forma generalizada até 48 horas de exposição ao Trichlorfon, com exceção dos edemas lamelares, os quais perduraram até 96 horas de exposição. Foi observada ainda a presença de congestão sanguínea em alguns tempos de exposição.

GILL et al. (1988) realizaram um trabalho com um peixe de água doce exposto cronicamente por 60 dias a dois diferentes tipos de organofosforados, Carbaril e Dimetoato, em doses subletais, buscando a análise das lesões branquiais. Como resultado, observaram separação do epitélio lamelar, trombozes lamelares, enrolamento e inchaço da lamela secundária e hipertrofia das células de cloreto.

O potencial genotóxico dos OPs Paration metílico e Fosfamídol foram avaliados através da indução de trocas de cromátides irmãs (TCI) e de aberrações cromossômicas em tecidos branquiais do peixe *Etroplus suratensis*. Peixes expostos a 0,05, 0,1 e 0,2 ppm de paration metílico e 0,5, 1,0 e 2,0 ppm de fosfamídol por um período de 96 horas revelaram aumento significativo no número de TCI e aberrações cromossômicas contra valores controle. Isso demonstrou que é possível usar peixes *in vivo* para descobrir o potencial genotóxico de poluentes (DAS & JONH, 1999).

1.2.4 Folidol[®] 600 - Composto Organofosforado em Estudo

De acordo com a Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-PR) e a Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB, 2002), o Folidol[®] 600 é extensamente utilizado na agricultura do estado do Paraná e possui a classe toxicológica de extremamente tóxico. As informações de bula do produto podem ser analisadas no Anexo I.

O Folidol[®] 600 apresenta em sua composição 600 g/L do princípio ativo Paration metílico (Methyl Parathion) (LARINI, 1987). Quimicamente, o Paration metílico é chamado de 0,0-dimetil-0-(4-nitrofenil) fosforotioato, sendo o nome técnico ou comum Paration metílico, Metil-paration, Metacide, Folidol 600, entre outros.

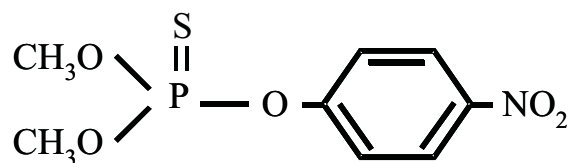


FIGURA 3 - Fórmula estrutural do Paration metílico.

O Paration metílico possui peso molecular de 263,20 e a fórmula bruta $C_8H_{10}NO_5PS$. Quando puro, é um sólido cristalino de cor branca, com ponto de fusão de 35-36°C. O produto de grau técnico é um líquido de coloração marrom com cheiro ativo de alho, tendo uma densidade que oscila de 1,20 a 1,36. Contêm cerca de 80% do composto puro.

O Paration metílico é pouco solúvel em água (55-60 ppm a 25 °C) e bastante solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Decompõe-se rapidamente em meio alcalino em proporção mais acentuada que o Paration etílico, transformando-se em diversas impurezas como o paraoxon metílico e O,S-dimetil-S-(4-nitrofenil) fosfato. É utilizado quase que exclusivamente como inseticida não sistêmico, na forma de concentrado emulsionável (em concentrações de até 60%), nas culturas de algodão. O seu uso é restrito em função de sua elevada toxicidade. Em água neutra, mantém sua estabilidade por diversos dias (ETO, 1987; LARINI, 1999; MARICONI et al., 1985).

A sua utilização, diluído em água, é feita por pulverizador costal, pulverizador de barra tratorizado, ou ainda por via aérea (SEAB, 2002). Com isso, é fácil imaginar que esse pesticida acabe por contaminar as águas vicinais das glebas cultivadas, diretamente ou carregado pelas chuvas. Um dos seus efeitos mais deletéricos é o de que os organismos aquáticos, particularmente os peixes, são afetados por tal prática.

1.3 CARACTERIZAÇÃO DO FÍGADO DE PEIXES TELEÓSTEOS

O fígado de peixes teleósteos tem um considerável volume em relação ao corpo. É de cor marrom rósea nas espécies livre carnívoras e marrom claro nas espécies herbívoras, porém em certos períodos do ano pode ser de cor amarelo e inclusive esbranquiçado. Nos peixes de exploração industrial, onde a alimentação está controlada, sua cor é habitualmente mais clara que nos peixes encontrados na natureza da mesma espécie. O fígado está situado no abdômen anterior, sendo que em algumas espécies se estende ao longo do abdômen, ou está estreitamente unido a outras vísceras. Em outras espécies é um órgão compacto que se combina com o pâncreas formando o hepatopâncreas, sendo que as células do pâncreas exócrino (pâncreas intra-hepático) encontram-se distribuídas pelo parênquima hepático ao longo da veia porta. Já, em outras espécies, o fígado se encontra completamente separado do pâncreas (ARANA, 1995; ROBERTS, 1981; TAKASHIMA & HIBIYA, 1995).

A histologia do fígado dos peixes difere da dos mamíferos em que os hepatócitos tem uma menor tendência a se dispor em cordões ou em lóbulos. Os sinusóides se encontram em menor número e distribuídos irregularmente entre os hepatócitos e estão revestidos de células endoteliais com núcleos muito proeminentes. Os canálculos biliares estão localizados centralmente em cada cordão hepático. O revestimento dos sinusóides não contem células de Kuppfer funcionais (ARANA, 1995; ROBERTS, 1981; VERLAG, 1982) e numerosos trabalhos comentam a escassez deste tipo celular (ARANA, 1995). Entre as células de revestimento dos sinusóides endoteliais e os hepatócitos se encontra o espaço de Disse, que contém microvilosidades de ambas, assim como um número de células de armazenamento de gordura chamadas de células de Ito (ARANA, 1995; ROBERTS, 1981; VERLAG, 1982).

O fígado é composto de células parenquimais (células hepáticas ou hepatócitos) e uma rede de fibras cuja função é de suportar as primeiras. A superfície do fígado é protegida com membrana serosa, e alguns tecidos conjuntivos dessa cápsula estendem para dentro do parênquima. O fígado apresenta um suprimento sanguíneo de dupla origem, recebendo sangue oxigenado das artérias hepáticas e sangue rico em nutrientes através da veia porta. A última, a veia porta,

que carrega sangue venoso do estômago e intestino, gradualmente ramifica-se e eventualmente divide para o interior em extensos capilares sanguíneos conhecidos como sinusóides. O sangue da veia porta e da artéria hepática passa pelos sinusóides, onde fica em contato íntimo com os hepatócitos para a troca de nutrientes e de produtos metabólicos e flui vagarosamente até a veia central (GARTNER & HIATT, 1999; VERLAG, 1982; YOUNG & HEATH, 2001).

O hepatócito tem um corpo celular poligonal arredondado contendo um núcleo central esférico claramente visível (ROBERTS, 1981; VERLAG, 1982), embora células binucleadas possam ser observadas. O núcleo é localizado na região central ou no pólo celular voltado para o sinusóide (ARANA, 1995) e usualmente possui um nucléolo bem evidente. A célula apresenta mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e outras organelas comuns no citoplasma das células animais. Grandes quantidades de material nutritivo como lipídeos e glicogênio levados ao fígado, os quais são armazenados no citoplasma das células hepáticas de peixes como produtos de reserva, em forma de vacúolos, sendo liberados como fonte de energia e glicose respectivamente, quando necessário (GARTNER & HIATT, 1999; ROBERTS, 1981; VERLAG, 1982; YOUNG & HEATH, 2001).

As células hepáticas são responsáveis por diversas funções essenciais para a sobrevivência da espécie. Representam um importante papel no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Servem como sítios de armazenamento para muitos nutrientes, como a glicose. Detoxificam o organismo. Além disso, estão envolvidas na hematopoiese durante a vida larval e na produção de anticorpos e na secreção da bile (KUMAR & ANSARI, 1986; VERLAG, 1982).

O tamanho dos hepatócitos em preparações microscópicas reflete o estado funcional fisiológico, e é marcadamente diferente nos estados hiperfuncional e hipofuncional. Um bom exemplo da aparência variável do hepatócito é a hipertrofia do volume celular, núcleo e nucléolo, que ocorre quase sempre no período ativo da vitelogenese em *P. altivelis* e em fêmeas de *Oncorhynchus masou* (VERLAG, 1982).

1.4 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE

O jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) (FIGURA 4), tem distribuição neotropical, do sudeste do México ao norte, até o centro da Argentina ao sul, ocorrendo em todo o Brasil (CARNEIRO et al., 2002; NELSON, 1994; PEREIRA, 1986; GOMES et al., 2000). Segundo esses autores, *R. quelen* é classificada taxonomicamente na família *Pimelodidae* e gênero *Rhamdia*. No Brasil, é comumente chamado jundiá, jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca (GOMES et al., 2000; PEREIRA, 1986; RODRÍGUEZ, 2004).

A coloração do jundiá varia de marrom-avermelhado claro a cinza ardósia. A pigmentação da parte inferior da cabeça é variável. Os barbilhões têm crescimento alométrico negativo e esta relação é provavelmente aumentada devido à grande possibilidade de dano dos barbilhões em exemplares grandes (GOMES et al., 2000). Apresenta o corpo desprotegido de escamas (NELSON, 1994).

R. quelen, vivem em lagos e poços fundos dos rios, preferindo os ambientes de águas mais calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Escondem-se entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite, à procura de alimento (GOMES et al., 2000). Juvenis de *R. quelen* suportam a transferência de água de 0% a 10% de salinidade, o que indica que essa espécie é estenoalina. Segundo GOMES et al. (2000), os juvenis suportam uma variação de pH na faixa de 4,0 a 8,5, mas estudos adicionais realizados pelos autores em laboratório (observações não publicadas) indicam que a tolerância dessa espécie ao pH alcalino pode ser ainda maior, chegando a pH 9,5.

Essa espécie pode ser considerada euritérmica, pois os juvenis aclimatados a 31°C suportam temperaturas de 15 a 34°C. O crescimento de *R. quelen* aumenta com o incremento da temperatura. Esse crescimento é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida. A taxa de crescimento dos machos é maior do que a das fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, quando a situação se inverte, pois estas passam a crescer mais rapidamente. Conseqüentemente, as fêmeas apresentam maior comprimento e idade que os machos, sendo que o tempo de vida teórico das fêmeas é de 21 anos e dos machos 11 anos (CARNEIRO et al., 2002; GOMES et al., 2000).

Adultos de *R. quelen* são onívoros, com uma clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos. Essa espécie movimentase à noite e sai de seus esconderijos depois das chuvas para se nutrir dos entulhos deixados ao longo dos rios (GOMES et al., 2000). A maturidade sexual é atingida por volta de um ano de idade nos dois sexos (CARNEIRO et al., 2002; GOMES et al., 2000).

R. quelen vem apresentando bons resultados em viveiros de piscicultura, principalmente no sul do país. Além disso, é uma espécie que apresenta excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para a pesca esportiva quanto para a alimentação (CARNEIRO et al., 2002; ULIANA et al., 2001).

Desta forma, consideramos que a espécie de peixe escolhida como organismo teste apresenta características importantes como modelo biológico, por ser um peixe de fácil aquisição, fácil adaptação ao laboratório sendo uma espécie nativa, de grande interesse comercial e muito abundante nos rios do Estado do Paraná.

Testes de toxicidade aguda em peixes são exigidos pela Legislação Brasileira para regular e classificar os pesticidas usados no Brasil. Apesar de *Brachydanio rerio* ser uma espécie padrão usada nesses bioensaios, devido à facilidade de manutenção em condições laboratoriais, ela não é uma espécie nativa da ictiofauna brasileira. Já, *Rhamdia quelen* é um peixe nativo nos rios do estado do Paraná onde OPs são freqüentemente usados, e conseqüentemente uma possível vítima dos efeitos desses compostos no ambiente natural. O uso dos peixes na fase juvenil e do OP em dose subletal visa alertar sobre possíveis efeitos de substância em uma concentração permitida pela legislação ambiental em peixes que ainda não passaram pela primeira reprodução. Neste trabalho, a proposta é usar a morfologia do fígado de *R. quelen* como indicador dos efeitos subletais da ação do Folidol® 600, um dos OPs de amplo uso na agricultura do estado do Paraná e do sul do Brasil na atualidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos subletais do organofosforado Folidol[®] 600 no tecido hepático, em juvenis de Jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) através de análises histopatológicas e ultraestruturais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar uma dose subletal do organofosforado Folidol[®] 600 para juvenis de *Rhamdia quelen*.
- Verificar as características morfológicas do tecido hepático de *R. quelen*, controle, através de análises histológicas e ultraestruturais.
- Verificar as características morfológicas do tecido hepático de *R. quelen*, submetidos a uma dose subletal de Folidol[®] 600, através de análises histológicas e ultraestruturais.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1.1 Aclimação Laboratorial de *Rhamdia quelen*

Os exemplares de *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) (Pimelodidae) (FIGURA 4) utilizados nos experimentos de determinação da dose subletal e testes de toxicidade do organofosforado Folidol[®] 600 foram doados pela piscicultura “Patronato Santo Antônio” da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (São José dos Pinhais – Paraná).

Os exemplares *R. quelen* utilizados na determinação da dose subletal de Folidol[®] 600 foram aclimatados ao laboratório por um período de sete dias, em aquários de 120 L, contendo água da rede de distribuição previamente purificada em dois filtros de polipropileno e dois filtros de carvão ativado. A água dos aquários foi aerada continuamente com a ajuda de compressores de ar acoplados a filtros contendo fibra acrílica e a temperatura foi ajustada através de aquecedores controlados por termostato. Os aquários tiveram suas faces laterais e posteriores revestidas com papel “contact” verde, proporcionando uma melhor adaptação dos peixes ao ambiente de laboratório (FANTA, 1995).

Variáveis como o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidas e registradas a cada 24 horas (ABNT, 1993; CETESB, 1990; GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; IAP, 1997). Os aparelhos utilizados para verificar as variáveis foram o EXTECH Model 695 pH/Conductivity e MO128 Dissolved Oxygen Meter.

O pH da água foi de 7,1 ($\pm 0,3$), a temperatura de 26°C ($\pm 0,6$) e o oxigênio dissolvido de 6,1 mg/L ($\pm 0,3$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz / 10 horas escuro. Os indivíduos foram alimentados uma vez ao dia, com ração Kowalski[®] para crescimento (extrusada) com 45% de proteínas. Devido a ração apresentar alta quantidade de proteínas, a água dos aquários foi trocada de dois em dois dias para evitar o acúmulo de amônia na água.

Para a realização dos testes de toxicidade, os animais foram aclimatados ao laboratório por um período de sete dias, nas mesmas condições dos animais submetidos à determinação da dose subletal (FIGURA 5A). Os animais

permaneceram em condições abióticas constantes, verificadas a cada 24 horas, sendo que a temperatura foi de 27° C (± 1), o pH de 7,3 ($\pm 0,5$) e o oxigênio dissolvido de 5,1 mg/L ($\pm 0,6$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz/ 10 horas escuro. Os animais foram alimentados uma vez ao dia, com ração Kowalsky®.

3.1.2 Determinação de uma Dose Subletal de Folidol® 600 para *Rhamdia quelen*

MOREIRA (1998), determinou a dose letal de 0,04 mL/L do organofosforado Folidol® 600, cujo princípio ativo é o Paration metílico (600g/L) para *Oreochromis niloticus*, a Tilápia do Nilo, em testes de toxicidade de 96 horas. Baseado nesta informação, *R. quelen* foi submetida a concentrações de 0,04 mL/L, 0,03 mL/L, 0,02 mL/L, e 0,01 mL/L de Folidol® 600 para a determinação da dose subletal. A concentração de Paration metílico, administrado via hídrica em *Rhamdia quelen* está descrita na TABELA 2 (ANEXO II).

Após o período de aclimatação, grupos de 10 animais foram submetidos ao período experimental agudo de 96 horas. Os aquários experimentais foram acondicionados em capela de exaustão de gases a fim de evitar a contaminação ambiental (FIGURA 6A). Já, o aquário controle foi mantido em ambiente aberto. Foi estabelecida a relação de 1 grama de peixe para 1 litro de água. Todos os exemplares de *R. quelen* eram juvenis, apresentando peso de 1,5 g ($\pm 0,7$), comprimento total de 5,9 cm ($\pm 0,8$) e comprimento padrão de 4,8 cm ($\pm 0,6$).

Os aquários, experimentais e controle, tiveram as mesmas condições abióticas da aclimatação, com exceção dos filtros de aeração que continham fibra acrílica. Esses foram substituídos por pedras porosas conectadas em mangueiras de aeração, para evitar que o contaminante fosse absorvido pela fibra.

O contaminante foi administrado via hídrica (SEAB, 2002) sendo gotejado nos aquários experimentais na superfície próxima ao aerador para que o mesmo se espalhasse por todo o aquário (FIGURA 6B). A via de administração do poluente foi a mesma utilizada na agricultura como informa a bula do produto descrita no ANEXO I. A contaminação foi realizada em horário pré-estabelecido, às 09:00 horas.

A determinação da dose subletal foi feita através de um bioensaio estático, isto é, na ausência de fluxo contínuo da água com o tóxico. Variáveis como o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido, foram medidas e registradas a cada 24 horas,

até o final do teste (ABNT, 1993; CETESB, 1990; GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; IAP, 1997). O pH da água foi de 7,6 ($\pm 0,4$), a temperatura de 27°C ($\pm 0,3$) e o oxigênio dissolvido em 6,2 mg/L ($\pm 0,6$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz/ 10 horas escuro.

O experimento de determinação da dose subletal de Folidol[®] 600 foi feito em triplicata.

3.1.3 Testes de Toxicidade

Após o período de aclimação, grupos de 10 animais foram submetidos aos testes de toxicidade para o estudo morfológico e ultraestrutural do fígado de *R. quelen*. Foi estabelecida a relação de 1 grama de peixe para 1 litro de água. Os animais utilizados apresentaram peso de 1,2 g ($\pm 0,4$), comprimento total de 5,4 cm ($\pm 0,6$) e comprimento padrão de 4,3 cm ($\pm 0,5$).

Com base na determinação da dose subletal descrita no item 3.1.2, e considerando que a dose subletal de um agente tóxico é aquela que não causa mortalidade para os organismos teste, *R. quelen* foi submetida experimentalmente a dose de 0,01 mL/L de Folidol[®] 600. Neste estudo, nesta dose, ocorreu 100% de sobrevivência dos indivíduos em 96 horas de exposição. Os animais controle permaneceram neste mesmo período e nas mesmas condições abióticas que os experimentais, exceto pela ausência de Folidol[®] 600.

O teste agudo foi feito através de um bioensaio estático (ABNT, 1993; CETESB, 1990; GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; IAP, 1997) durante um período de 96 horas. Todos os aquários foram contaminados por via hídrica (FIGURA 6B). A contaminação foi realizada em horário pré-estabelecido, às 09:00 horas.

Os aquários experimentais foram acondicionados em capela de exaustão de gases (FIGURA 5B), enquanto que os aquários controle permaneceram fora da capela (FIGURA 5A). Tanto os animais experimentais quanto os animais controle foram alimentados uma vez ao dia com o mesmo tipo de ração oferecida durante a aclimação.

As condições abióticas foram constantes, controladas a cada 24 horas até o final do teste (ABNT, 1993; CETESB, 1990; GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990;

IAP, 1997), sendo a temperatura de 27°C (± 1), o pH de 7,3 ($\pm 0,5$) e o oxigênio dissolvido de 5,2 mg/L ($\pm 0,6$). O fotoperíodo foi de 14 horas luz / 10 horas escuro.

Após a contaminação com o poluente, cinco indivíduos controle e dez experimentais foram sacrificados seguindo os tempos de 4 hs, 24 hs, 48 hs, 72 hs e 96 hs de exposição ao Folidol[®] 600 e o fígado retirado seguindo processamento de rotina para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão (FIGURA 7A).

Os exemplares utilizados em todos os experimentos citados foram transferidos para o biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR) após terem sido submetidos à remoção do fígado, sendo recolhidos pela Coleta Hospitalar da Prefeitura Municipal de Curitiba. Os resíduos químicos gerados nestes experimentos foram armazenados em recipientes de plástico apropriados sendo devidamente identificados com o volume de água e a concentração de Folidol[®] 600. Em seguida foram transferidos para o depósito de resíduos químicos da Prefeitura da UFPR, localizado no Campus do Centro Politécnico – Setor de Ciências Biológicas - UFPR (FIGURA 7B), onde teriam destino de tratamento.

3.2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ULTRAESTRUTURAL

3.2.1 Fixação e Processamento para Microscopia de Luz das Amostras de Fígado de *Rhamdia quelen*

R. quelen, controle e experimental, oriundas dos testes de toxicidade foram sacrificadas após secção medular, passando-se à dissecação, exposição, e coleta do fígado através de um corte na parte ventral no sentido posterior-anterior. O fígado foi imediatamente fixado em Alfac em temperatura ambiente por 16 horas para o processamento histológico (ANEXOS III e IV).

Em seguida, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente, o que ocasionou uma retirada lenta e suave da água, evitando alterações dos tecidos e células. Na seqüência, as peças sofreram diafanização em xileno, impregnação, inclusão e emblocagem em Paraplast Plus[®]. Os blocos obtidos foram trimados e microtomados a 3 μ m com um micrótomo para parafina marca Leica RM 2145. Os cortes foram colocados em lâminas recobertas com uma fina camada de Albumina

de Mayer (CULLING et al., 1985) (ANEXO III) e água, sendo a distenção dos cortes realizada em placa aquecedora.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.), conforme procedimento descrito nos ANEXOS III e V. A coloração de H.E. permitiu a identificação dos tipos celulares existentes no fígado, sendo que os elementos basófilos nucleares e citoplasmáticos foram corados com a hematoxilina enquanto que as estruturas acidófilas foram coradas pela eosina (CLARK, 1981).

O meio de montagem utilizado para preparação das lâminas permanentes foi a resina Permout®[®], seguida de secagem em temperatura ambiente. As preparações foram feitas no Laboratório de Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular da UFPR (FIGURAS 7C e 7D). As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus BH2, do Laboratório de Impacto Ambiental da Universidade Federal do Paraná.

3.2.2 Fixação e Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão das Amostras de Fígado de *Rhamdia quelen*

R. quelen, controle e experimental, oriundos do teste de toxicidade foram sacrificadas após secção medular, passando-se à dissecação, exposição e coleta do fígado através de um corte na parte ventral no sentido posterior-anterior. As amostras de fígado foram imediatamente fixadas em Karnovsky (CULLING et al., 1985; GLAUBERT, 1986 modificado) por 4 horas e em seguida armazenadas em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 a 4°C.

Após a fixação, o material foi lavado em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 e pós-fixado com tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 por 1 hora. O material foi contrastado, em bloco com acetato de uranila aquosa 2% durante 2 horas e desidratado em série alcoólica crescente, procedendo-se à substituição do álcool pela acetona P.A. As amostras preparadas foram embebidas em mistura de acetona e resina Epon-812 1:1, impregnados e incluídos em Epon-812 em mistura balanceada (LUFT, 1961). A polimerização foi efetuada em estufa a 60°C durante 72 horas. As soluções utilizadas e as etapas deste processamento estão descritas nos ANEXOS III e VI respectivamente, e foram realizadas no

Laboratório de Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular da UFPR (FIGURAS 7C e 7D).

Os cortes ultrafinos (30-50 nanômetros) foram obtidos em ultramicrotomo Sorval^(R) Porter Blum MT-2 do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, com utilização de navalha de diamante, sendo colhidos em telas de cobre de malha 200. Foram contrastados em solução de acetato de uranila aquosa a 2% (WATSON, 1958) e nitrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico JEOL-JEM 1200 EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

3.2.3 Análise das Lâminas em Microscopia Óptica

As alterações histológicas observadas no fígado foram avaliadas após a digitalização e análise de 10 imagens (ou campos) aleatórias em cada lâmina histológica confeccionada. Foi analisada uma lâmina de cada animal, controle e experimental, em todos os tempos. O microscópio de análise de imagem utilizado foi o Olympus BX51 acoplado a um computador contendo o Programa Image Pró Express[®]. Este microscópio pertence ao Departamento de Zoologia da UFPR.

Para verificar a densidade de hepatócitos presentes e a densidade de hepatócitos que apresentaram pigmento biliar no citoplasma utilizou-se uma área de 2,931 mm² (área do campo). Já, para a contagem da densidade de melanomacrófagos e da densidade de congestão sanguínea, utilizou-se uma área de 19,846 mm² (área do campo). Foram contadas e determinadas a densidade destas alterações utilizando-se a área total do campo. As contagens visuais foram realizadas no programa Adobe Photoshop[®] 6.0 com o auxílio de marcações com códigos de cores sobre a estrutura avaliada.

A presença de focos de necrose e de degeneração hidrópica (ou edema intracelular) no parênquima hepático foi analisada e documentada através de um Fotomicroscópio Olympus BH2, do Laboratório de Impacto Ambiental (Departamento de Biologia Celular) da UFPR. Estas alterações foram analisadas, em todos os tempos experimentais e controle, escolhendo-se de forma aleatória 10 campos de cada lâmina histológica utilizando-se um aumento de 400x. De acordo com o grau de

ocorrência, foram atribuídos parâmetros de avaliação para estas alterações, sendo: Tecido Inalterado, quando não foi verificada a presença destas alterações; Ocorrência Ocasional, quando as alterações foram encontradas em 20% da área analisada; Ocorrência Moderada, quando as alterações foram encontradas em 40% da área analisada e Ocorrência Severa quando as alterações foram encontradas em 60% da área analisada.

3.2.4 Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente e os valores numéricos foram expressos em mediana. Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA). Através do teste de Bartlett verificou-se a homocedasticidade dos dados e a normalidade foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilks. Quando os pré-requisitos da ANOVA (homocedasticidade e normalidade) não foram atendidos, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado posteriormente para verificar as diferenças ocorridas nos peixes contaminados e no grupo controle, sendo seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnet's após o Kruskal-Wallis para verificar quais tempos e controle diferiam entre si, comparando-se dois a dois. Na análise de focos de necrose, por esta ser uma alteração de escala nominal, obteve-se os resultados estatísticos utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnet's para verificar quais tempos e controle diferiam entre si, comparando-se dois a dois.

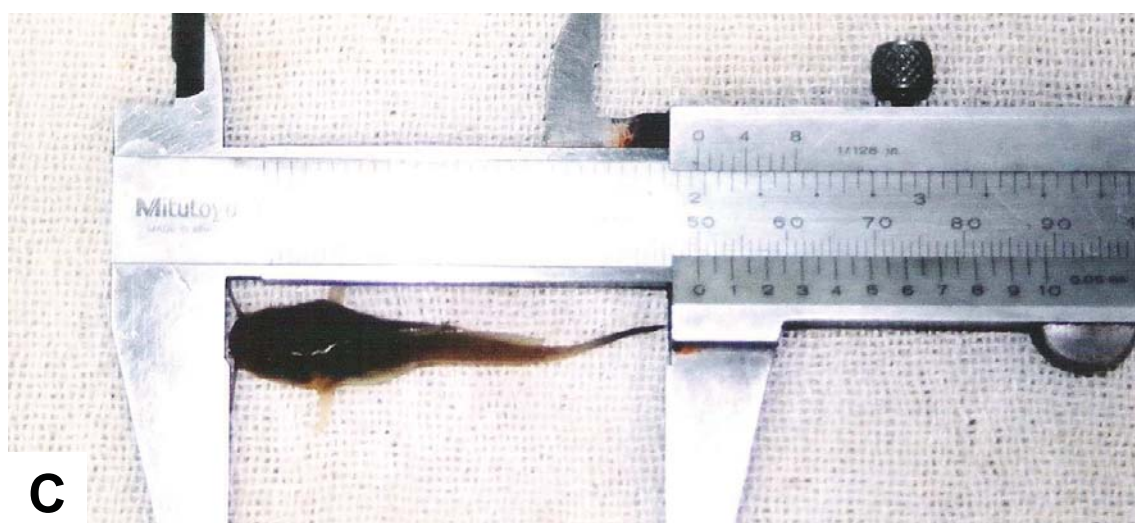
A análise com os animais controle (n=5) foi avaliada para verificar a existência ou não de diferença significativa entre eles em relação aos tempos de 4h, 24h, 48h, 72h e 96 horas. Após obter os resultados estatísticos como não houve diferença entre os animais controle, separou-se aleatoriamente dentre esses (população controle com 25 animais) 10 indivíduos (amostra controle) formando um único grupo controle. O intervalo de confiança da média da amostra controle foi analisado com a média população controle para verificar se a amostra escolhida representava bem a população. Para cada teste realizado considerou-se um nível de significância de 5%. Utilizou-se os programas GraphPad InStat v. 3.0 e Statgraphics® versão 5.0 para a realização dos testes. Os conjuntos de dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.



A



B



C

FIGURA 4 – INDIVÍDUOS DE *Rhamdia quelen* (JUNDIÁ). **A** – Jundiá em detalhe. **B e C** – Tamanhos mais comum de *R. quelen* utilizados nos experimentos.

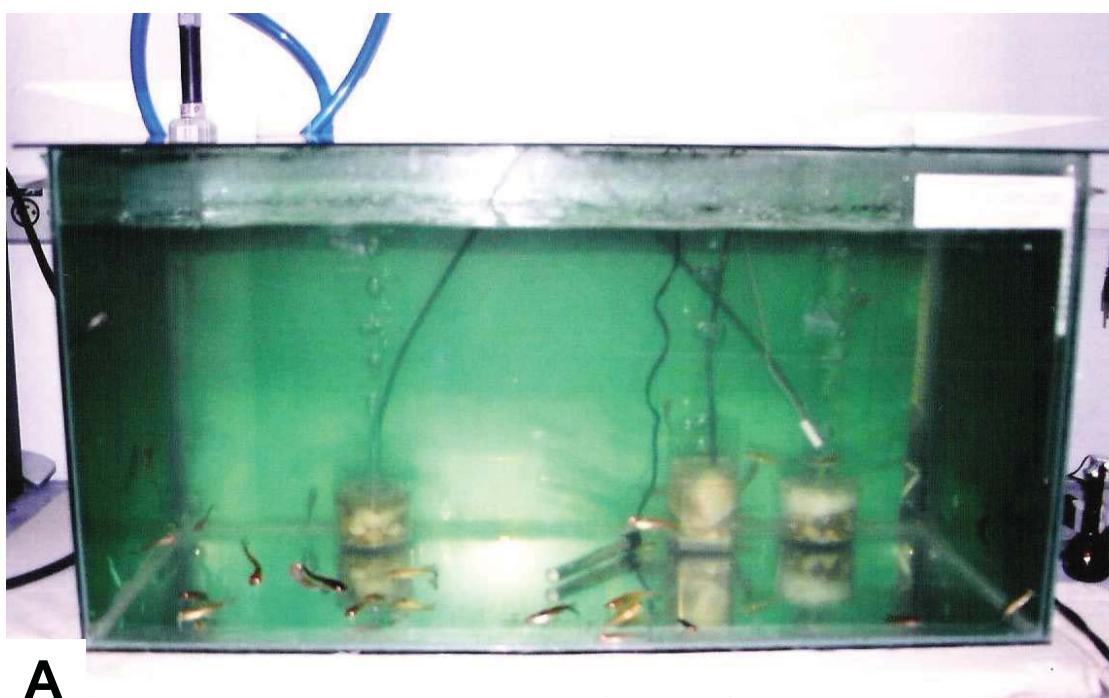
**A****B**

FIGURA 5 – TESTES DE TOXICIDADE DE FOLIDOL® 600 PARA *Rhamdia quelen*. **A** – Aquário controle contendo *Rhamdia quelen*. **B** – Disposição dos aquários experimentais no interior da capela de exaustão de gases. Os aquários experimentais foram contaminados com a dose subletal de 0,01 mL/L de Folidol® 600.

**A****B**

FIGURA 6 – DETERMINAÇÃO DA DOSE SUBLETAL DE FOLIDOL[®] 600 PARA *Rhamdia quelen*. **A** – Disposição dos aquários experimentais e controle (observar os aquários controle fora da capela de exaustão de gases e os aquários experimentais no interior da capela os quais foram contaminados com diferentes doses de Folidol[®] 600). **B** – Momento da contaminação.



FIGURA 7 – PRÁTICA METODOLÓGICA. A – Dissecção dos exemplares. **B –** Local aonde foram armazenados os resíduos gerados nos experimentos pertencente a Prefeitura da UFPR. **C e D -** Laboratório do Grupo de Estudos de Impacto Ambiental (Geia), onde foram realizados os processamentos histológico e ultraestrutural das amostras de fígado.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DE UMA DOSE SUBLETAL DE FOLIDOL® 600 PARA *Rhamdia quelen*

Os organismos teste foram expostos ao Folidol® 600 por um período de 96 horas para a determinação de uma dose subletal, sendo que os resultados podem ser observados na TABELA 1.

Com base nos resultados obtidos, a dose de 0,01 mL/L de Folidol® 600 correspondendo a 6 mg/L do princípio ativo Paration metílico, foi considerada subletal, sendo escolhida para o experimento agudo, visando a análise histológica e ultraestrutural do tecido hepático. Os animais dos grupos controle, que não receberam o contaminante, permaneceram dentro dos padrões normais de sobrevivência durante todo o período experimental.

TABELA 1 - Número de peixes mortos correspondente à concentração de Folidol® 600 administrada.

Concentração de Folidol® 600 em mL/L	Nº inicial de peixes	Nº de peixes mortos por período de observação (horas)			
		24	48	72	96
		24	48	72	96
0,04	10	10	-	-	-
0,03	10	10	-	-	-
0,02	10	10	-	-	-
0,01	10	0	0	0	0
Controle	10	0	0	0	0
0,01 - repetição 1	10	0	0	0	0
0,01 - repetição 2	10	0	0	0	0
Controle - repetição 1	10	0	0	0	0
Controle - repetição 2	10	0	0	0	0

4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen*: ANIMAIS CONTROLE

O tecido hepático de *R. quelen* é constituído principalmente por hepatócitos, os quais possuem geralmente a forma poliédrica (FIGURAS 8A, 8B, 8C e 8D) com um único núcleo arredondado tendo um ou mais nucléolos (FIGURAS 8C, 8D, 9A e 9D). No núcleo que mostra uma tendência a esfericidade, a eucromatina é mais dispersa, homogênea e menos eletrodensa que a heterocromatina, mostrando-se abundante. Já, a heterocromatina apresentou-se em quantidade bastante reduzida confirmando a alta atividade metabólica destas células (FIGURA 9D). O citoplasma apresenta aspecto vacuolizado (FIGURAS 8B e 9A) e a membrana plasmática é bem definida (FIGURAS 8D, 9A e 9C). Células pigmentadas chamadas de melanomacrófagos (FIGURA 10B), foram encontradas distribuídas pelo parênquima hepático. O tecido hepático possui vasos de diferentes calibres distribuídos por todo o parênquima hepático (FIGURA 8A), onde se observa a veia porta (FIGURAS 8A e 10A). A veia central se ramifica em sinusóides que penetram em sua parede (FIGURAS 8A e 8B). Observamos a presença de células sangüíneas do tipo eritrócitos e linfócitos no interior dos vasos sinusóides (FIGURAS 10B, 11D e 11E). Os ductos biliares constituídos por células epiteliais cúbicas (FIGURA 10B) foram encontrados distribuídos pelo parênquima hepático geralmente associados com a veia porta (FIGURA 10A). O fígado associado com o pâncreas forma o hepatopâncreas, sendo possível observar células do pâncreas exócrino (pâncreas intra-hepático) distribuídas entre o parênquima hepático ao longo da veia porta (FIGURAS 10A e 10B).

Grânulos semelhantes a glicogênio foram observados (FIGURA 9D). Os hepatócitos possuem várias mitocôndrias, freqüentemente agregadas, na maioria dos casos associadas às regiões em que se encontra o retículo endoplasmático rugoso (RER) (FIGURA 9B). Este se apresentou concentrado em regiões próximas ao núcleo em cisternas paralelas, próximas à membrana plasmática dos hepatócitos e em continuidade com a membrana externa do envoltório nuclear, constituindo este um padrão para o material controle (FIGURAS 8D, 9B, 9C e 9D). Observou-se gotículas lipídicas ocasionais dispersas pelo citoplasma que aparecem como corpos esféricos havendo alto polimorfismo (FIGURAS 9B e 9C), as quais são comuns

como estoque regulador de energia em peixes. O canalículo biliar, formado pela membrana plasmática dos hepatócitos foi observado, sendo que o lúmen do canalículo é preenchido por microvilos dos hepatócitos adjacentes (FIGURAS 11A, 11B e 11C). Os hepatócitos estão unidos ao canalículo biliar por especializações de membrana do tipo desmossomos (FIGURA 11C). Encontrou-se o espaço de Disse, caracterizado por um pequeno espaço de tecido conjuntivo entre os hepatócitos e o endotélio dos capilares sinusóides (FIGURAS 11D e 11E). Há numerosas microvilosidades irregulares que se estendem da superfície do hepatócito para o interior do espaço de Disse (FIGURA 11E), aumentando bastante a área de superfície para as trocas metabólicas.

ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DO FÍGADO DE
***Rhamdia quelen* CONTROLE**

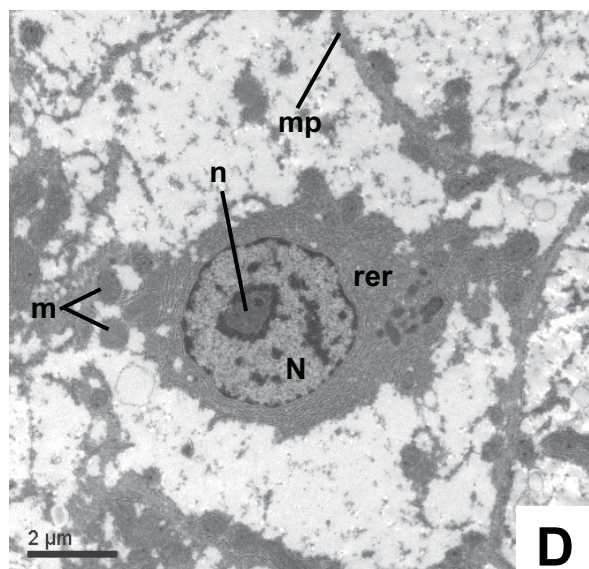
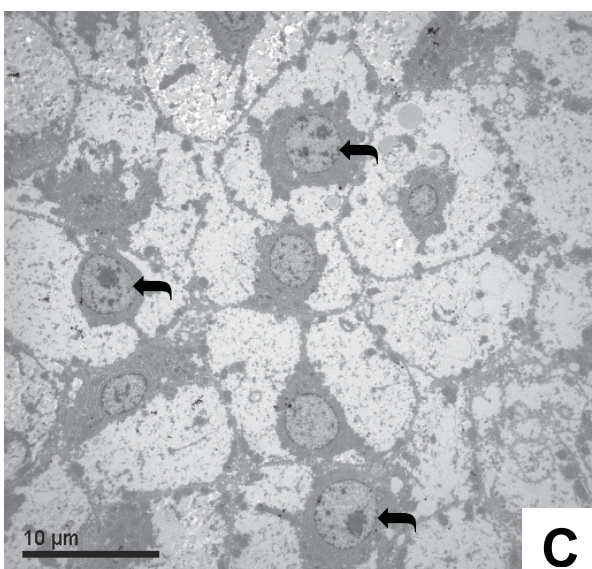
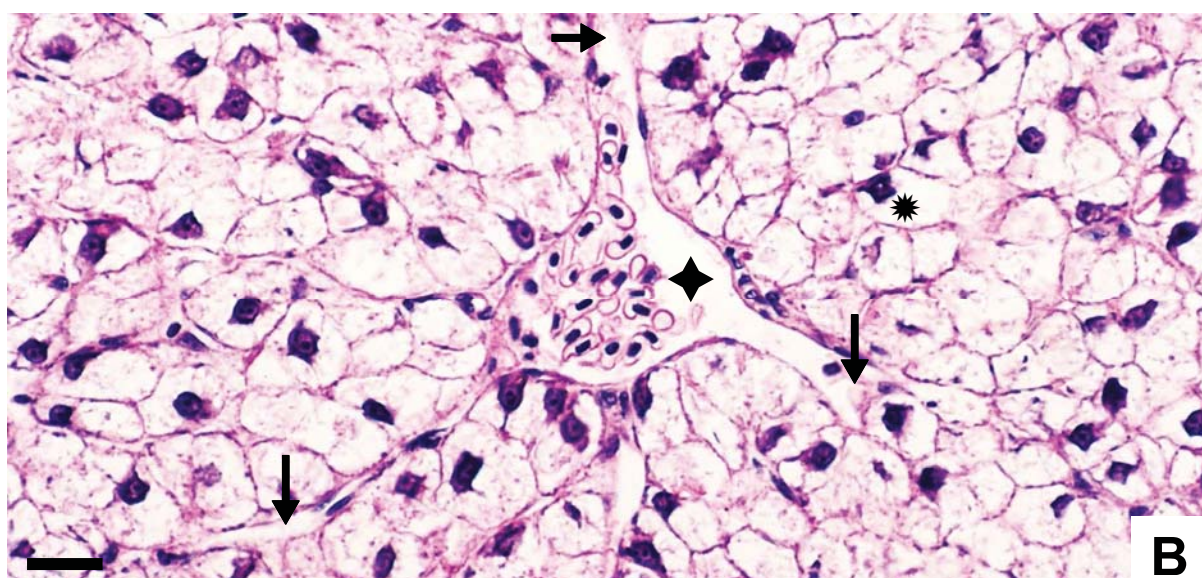
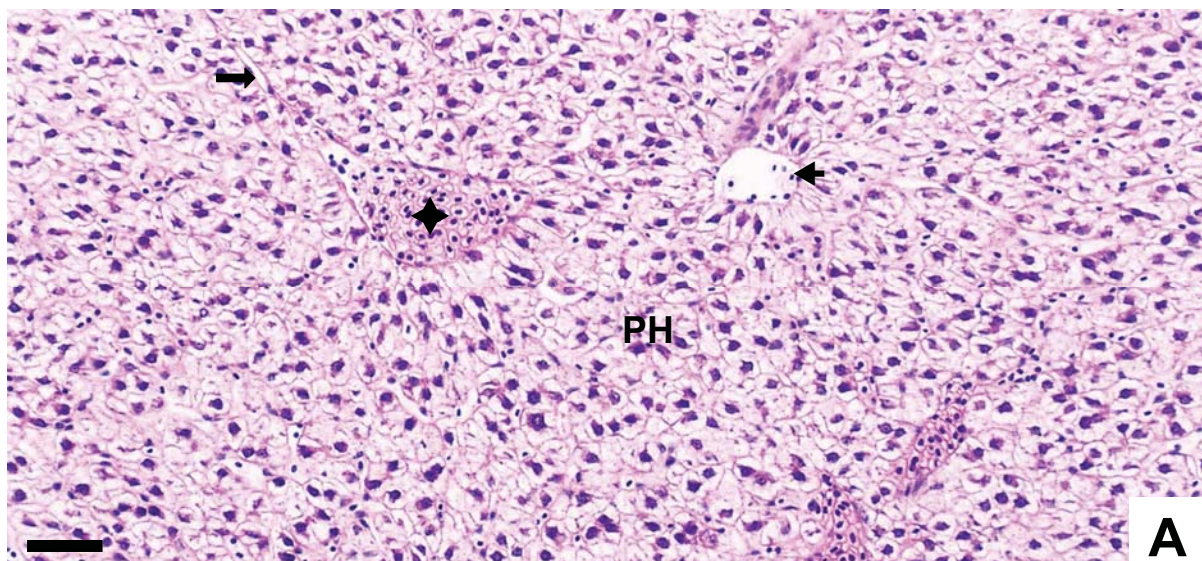


FIGURA 8 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTROLE. **A** – Observar: aspecto geral do parênquima hepático (**PH**), veia central (**◆**), vaso sinusóide com abertura para veia central (**→**), veia porta (**◄**). Microscopia de luz. Escala: 50 µm. Coloração H.E. **B** - Veia central com eritrócitos (**◆**), vaso sinusóide com abertura para veia central (**→**), forma poliédrica dos hepatócitos com aspecto vacuolizado do citoplasma (*****). Microscopia de luz. Escala: 25 µm. Coloração H.E. **C** – Parênquima hepático mostrando forma poliédrica dos hepatócitos e núcleos com tendência a esfericidade (**↔**). Microscopia eletrônica de transmissão. **D** - Hepatócito em evidência apresentando forma poliédrica, núcleo (**N**) com nucléolo bem evidente (**n**), RER associado ao núcleo (**rer**), mitocôndria (**m**) e membrana plasmática bem definida (**mp**). Microscopia eletrônica de transmissão.

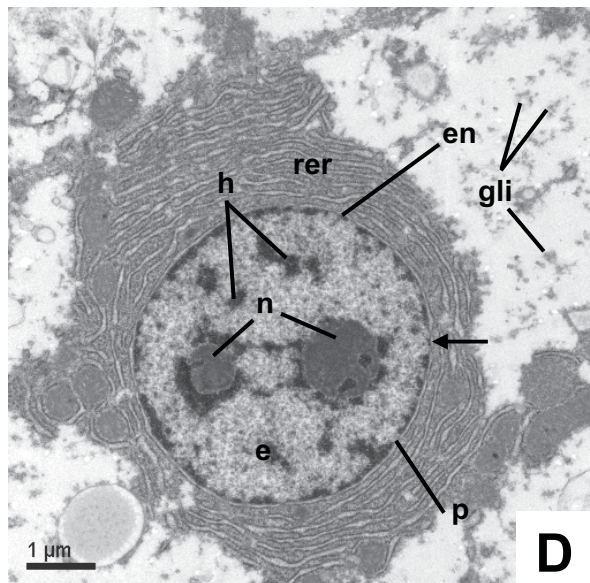
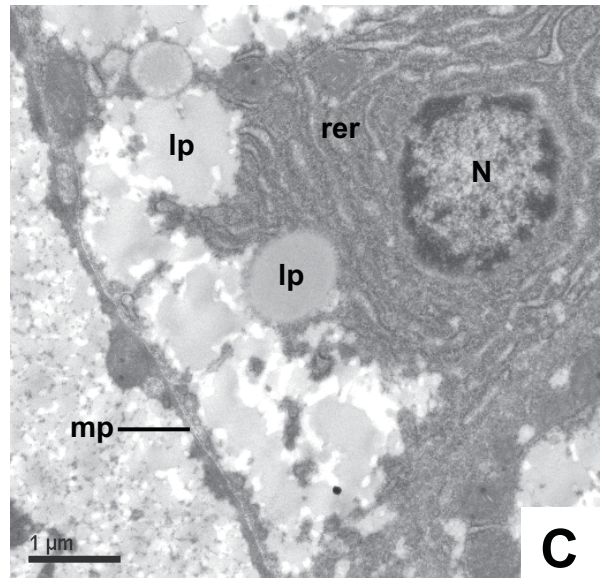
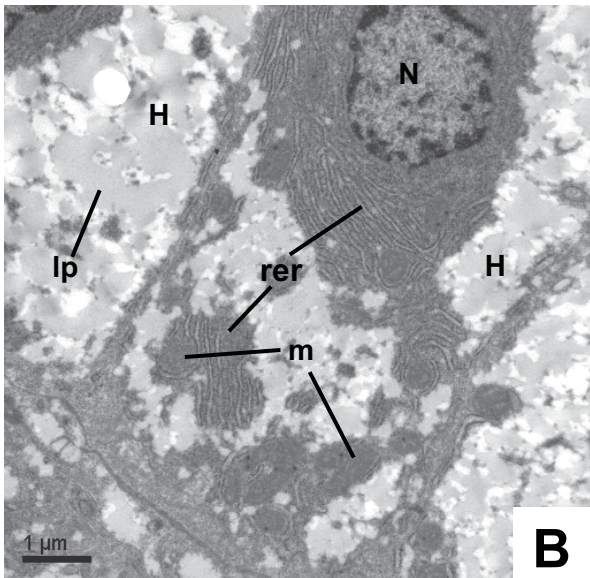
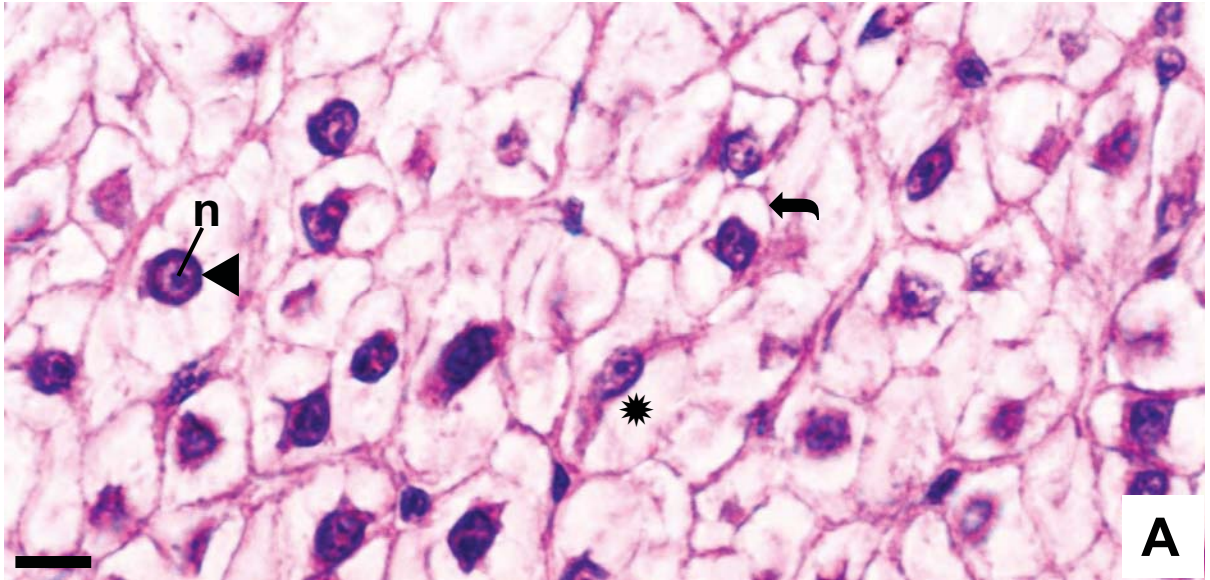


FIGURA 9 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTROLE. **A** - Contorno da membrana plasmática bem definido (◀), aspecto vacuolizado do citoplasma (*), núcleo com tendência a esfericidade (◀) com nucléolo bem evidente (n). Microscopia de luz. Escala: 10 µm. Coloração H.E. **B** - Hepatócitos adjacentes (H), núcleo (N), mitocôndrias (m) abundantes associadas ao RER (rer) e gotícula contendo material lipídico (lp). Microscopia eletrônica de transmissão. **C** – Gotículas lipídicas (lp), RER (rer) em cisternas paralelas em torno do núcleo (N) e membrana plasmática evidente (mp). Microscopia eletrônica de transmissão. **D** – Observar a tendência esférica do núcleo (◀) com nucléolos proeminentes (n), eucromatina abundante, homogênea e clara (e), a heterocromatina em quantidade bastante reduzida (h), poro nuclear (p), envoltório nuclear (en) empilhamento regular das cisternas do RER (rer) e grânulos semelhante a glicogênio (gli). Microscopia eletrônica de transmissão.

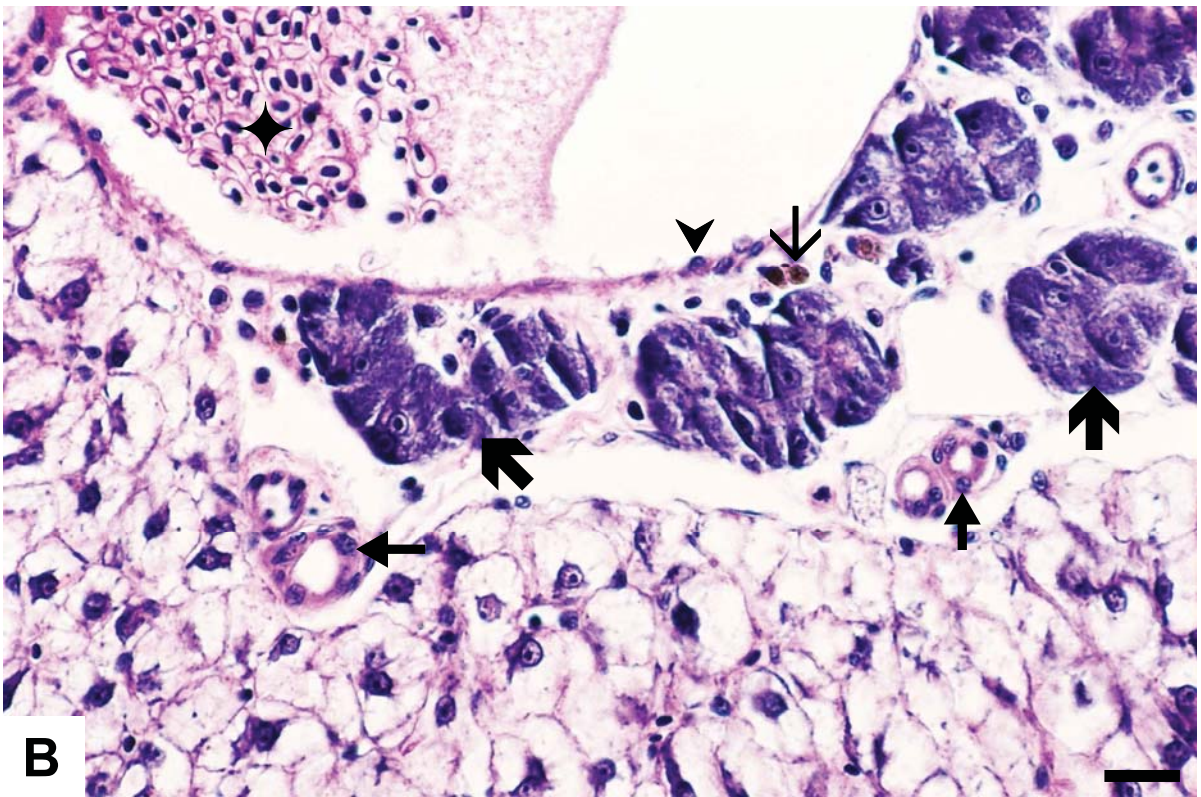
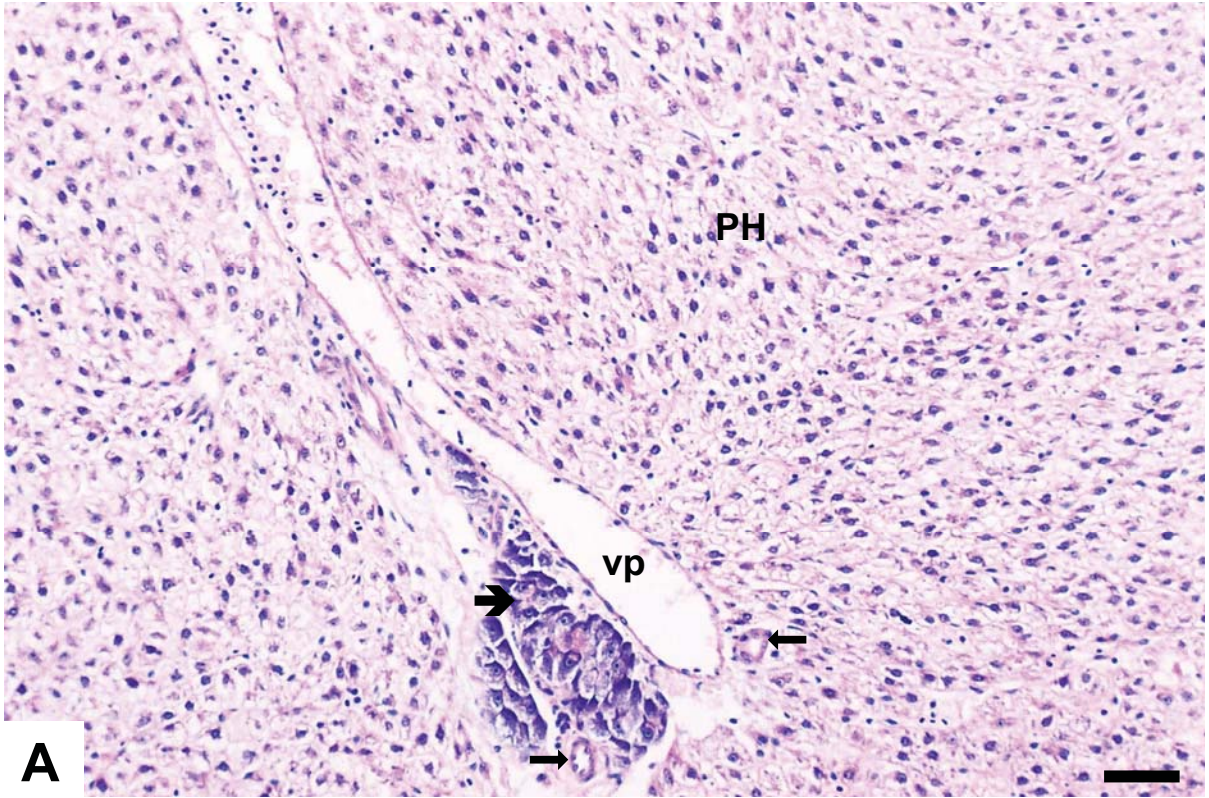


FIGURA 10 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTROLE. **A** – Observar: Região do pâncreas intra-hepático (➔) ao longo da veia porta (**vp**), parênquima hepático (**PH**) e ductos biliares associados a veia porta (➜). Microscopia de luz. Escala: 50 µm. Coloração H.E. **B** – Região com células do pâncreas exócrino (⬛), ducto biliar com epitélio cubóide (➔), células endoteliais da parede do vaso (▼), eritrócitos (◆) e melano-macrófagos (↓). Microscopia de luz. Escala: 25 µm. Coloração H.E.

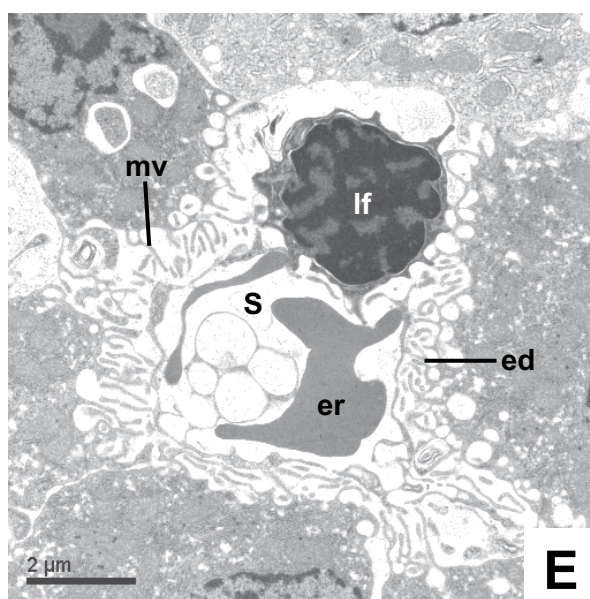
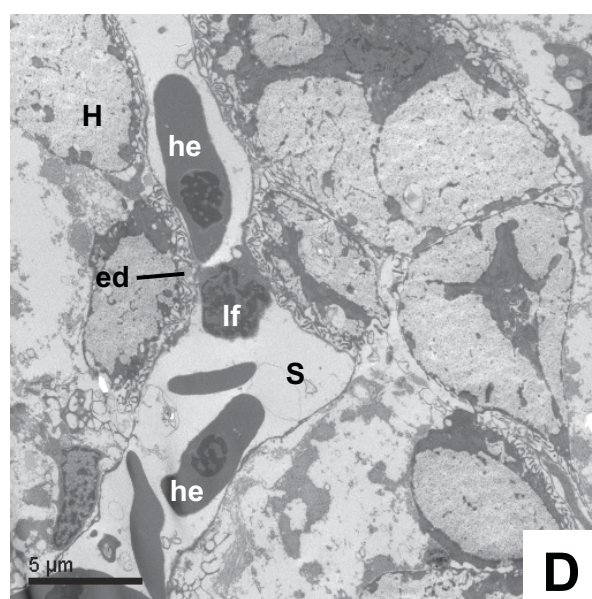
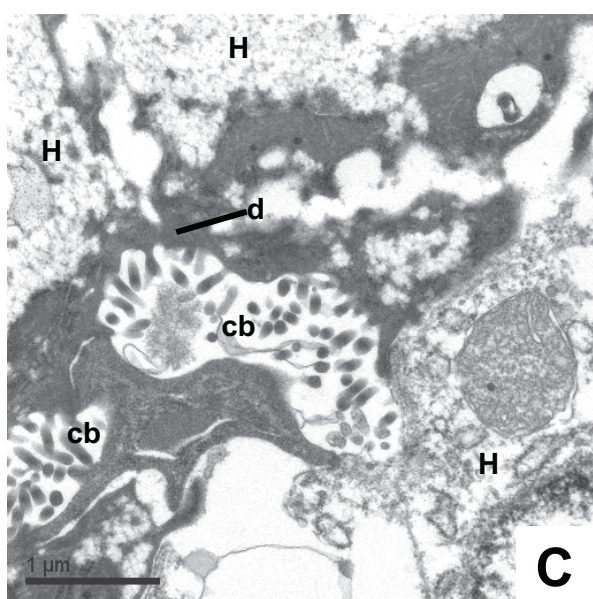
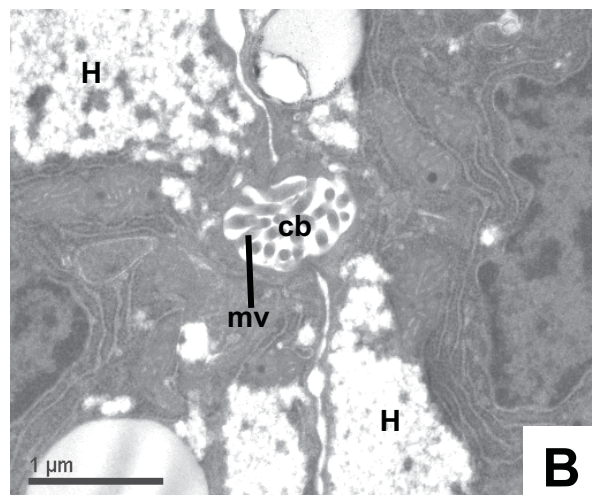
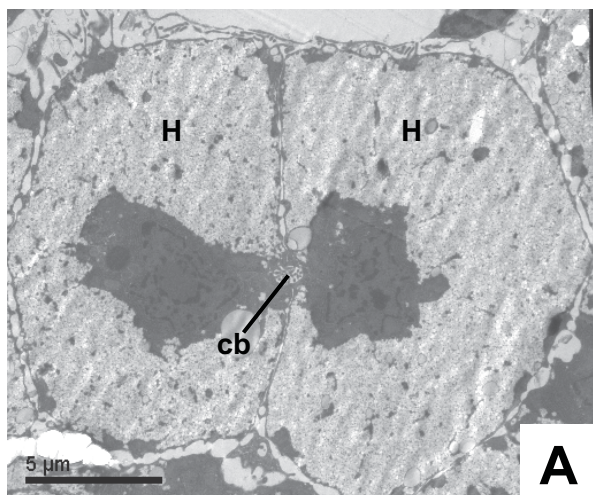


FIGURA 11 – ORGANIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DE FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTROLE. Observar: **A** - Hepatócitos adjacentes (**H**) e canalículo biliar (**cb**). Microscopia eletrônica de transmissão. **B** – Canalículo biliar (**cb**) entre dois hepatócitos adjacentes (**H**), observar microvilosidades no interior do canalículo biliar (**mv**). Microscopia eletrônica de transmissão. **C** – Canalículos biliares (**cb**) entre hepatócitos adjacentes (**H**), sendo que os hepatócitos estão unidos ao canalículo biliar por especializações de membrana do tipo desmossomos (**d**). Microscopia eletrônica de transmissão. **D** – Vaso sinusóide (**S**) com células sanguíneas do tipo hemácea (**he**) e linfócito (**lf**), hepatócito (**H**), visualização do espaço de Disse (**ed**) situado entre a membrana do hepatócito e o endotélio do sinusóide. Microscopia eletrônica de transmissão. **E** – Sinusóide (**S**) com linfócito (**lf**) e eritrócito (**er**) e visualização do espaço de Disse (**ed**) com microvilosidades no seu interior (**mv**). Microscopia eletrônica de transmissão.

4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTAMINADO COM FOLIDOL® 600

As análises histopatológicas do fígado de juvenis de *R. quelen* expostos a dose subletal de 0,01 mL/L do OP Folidol® 600 revelaram alterações em todos os tempos de exposição testados. Inicialmente, a histopatologia será descrita de forma qualitativa e posteriormente quantitativamente.

4.3.1 Tempo de Exposição 4 horas

Após 4 horas de exposição ao Folidol® 600, as células hepáticas mostraram perda, em alguns locais, da visualização do limite e do conteúdo celular (FIGURA 12B) e focos de necrose no parênquima hepático (FIGURA 12A). A presença de grânulos de cor amarelo-marrom-dourado no citosol, denominados de pigmentos biliares, foi observado (FIGURAS 14A e 15D). Ultraestruturadamente encontrou-se grânulos eletrondensos no citosol com função desconhecida (FIGURAS 12B e 12C). Observou-se a presença de melano-macrófagos espalhados entre as células hepáticas (FIGURAS 14A e 15C). Os vacúolos citoplasmáticos foram visualizados neste tempo de exposição com alta incidência, provocando áreas não coradas pela eosina em muitas regiões do fígado (FIGURA 12A). Verificou-se hepatócitos com alta incidência de gotículas lipídicas (FIGURA 12E). O retículo endoplasmático rugoso (RER) não se apresentou organizado em torno do núcleo, havendo desestruturação (FIGURA 12D). Alguns núcleos mantiveram forma relativamente regular, outros ocasionalmente apresentaram-se picnóticos com escassez de eucromatina, mostrando regiões claras, com muita heterocromatina (FIGURA 12C). As mitocôndrias mostraram-se rompidas (FIGURA 12C). Alguns vasos apresentaram descaracterização do endotélio. Observou-se infiltração leucocitária e congestão sanguínea.

4.3.2 Tempo de Exposição 24 horas

Após 24 horas de exposição ao Folidol® 600 observou-se a presença de focos de necrose (FIGURA 13B) e perda, em alguns locais, da forma (FIGURA 13E) e da visualização do limite celular (FIGURAS 13A e 13C). Melano-macrófagos foram encontrados espalhados em alguns locais do parênquima hepático. Grande quantidade de grânulos grosseiros os quais foram fortemente corados pela eosina foram observados no citoplasma demonstrando uma tendência da diminuição do aspecto vacuolizado (FIGURA 13A). Ultraestruturalmente verificou-se grânulos eletrondensos de tamanhos variados (FIGURAS 13C e 13D). O RER apresentou-se desorganizado, em vários locais do citosol e não em cisternas paralelas (FIGURA 13E). Mitocôndrias foram encontradas com abundância (FIGURA 13E). Observou-se alta incidência de gotículas lipídicas dispersas pelo citosol (FIGURA 13D). Infiltração leucocitária em alguns pontos do tecido hepático foi encontrada (FIGURA 15B). A presença de congestão sanguínea foi observada no parênquima hepático (FIGURA 17A). Observou-se o limite de vasos sanguíneos desestruturados (FIGURA 13B) e a presença de núcleos picnóticos em alguns hepatócitos.

4.3.3 Tempo de Exposição 48 horas

Após 48 horas de exposição ao Folidol® 600 as lesões permaneceram as mesmas verificadas no tempo de 24 horas (FIGURAS 14A, 14B e 14C). A alteração mais evidente foi o aspecto do parênquima hepático. Este mostrou-se bastante danificado, com a presença de focos de necrose (FIGURAS 14B e 14C). Houve grande perda do contorno de células e de vasos sanguíneos (FIGURAS 14A, 14B e 14C). Aspecto menos vacuolizado do hepatócito foi observado (FIGURA 14E). Observou-se melano-macrófagos no parênquima hepático neste tempo de exposição (FIGURA 14A). Pigmentos biliares foram observados com alta incidência (FIGURA 14A). Ultraesturutralmente encontrou-se uma grande incidência de gotículas lipídicas no citosol dos hepatócitos quando comparamos com o controle (FIGURAS 14B, 14C e 14D). Núcleo picnótico foi observado (FIGURAS 14A e 14B).

4.3.4 Tempo de Exposição 72 horas

Após 72 horas de exposição ao Folidol[®] 600 os danos no tecido hepático continuaram intenso, por existir muitos focos de necrose (FIGURA 15A), assim como a perda do contorno dos hepatócitos (FIGURAS 15D e 15G) e de vasos sanguíneos (FIGURA 15A). O parênquima hepático continuou mostrando uma tendência da diminuição do aspecto vacuolizado (FIGURA 15A). O número de hepatócitos com pigmento biliar continuou aumentando assim como grânulos grosseiros corados pela eosina (FIGURA 15D). O RER continuou mostrando-se desorganizado (FIGURAS 15F e 15G). Mitocôndrias mostraram-se abundantes (FIGURA 15F). Ultraestruturalmente observou-se grânulos eletrondensos de composição química desconhecida envolto por dupla membrana (FIGURA 15E e 15F). Verificou-se a presença de infiltração leucocitária (FIGURA 15B). Os melano-macrófagos também foram visualizados distribuídos entre os hepatócitos (FIGURA 15C). Alguns núcleos picnóticos estiveram presentes (FIGURA 15D). A presença de congestão sanguínea foi observada no parênquima hepático (FIGURA 17A).

4.3.5 Tempo de Exposição 96 horas

Após 96 horas de exposição ao Folidol[®] 600 o contorno celular foi indistinguível (FIGURAS 16A e 16B), sendo que ocasionalmente encontrou-se hepatócitos com contorno celular visível. Necroses focais continuaram aparecendo, além de desestruturação de vasos sanguíneos (FIGURA 16A). Observou-se um aspecto vacuolizado do citosol (FIGURAS 16A, 16B, 16C, 17A e 17B), embora o citoplasma de muitos hepatócitos apresentou material desconhecido os quais foram fortemente corados pela eosina. Grânulos de glicogênio no citoplasma foram observados (FIGURA 16E). Grânulos eletrondensos foram encontrados no citosol (FIGURAS 16B e 16C). Verificou-se material semelhante a lipídio no citoplasma (FIGURAS 16D e 16E). O RER continuou mostrando desestruturação (FIGURAS 16B, 16C, 16D e 17B). Infiltração leucocitária (FIGURA 15B) e congestão sanguínea (FIGURA 17A) foram encontrados em todos os animais analisados. Melano-macrófagos foram encontrados em vários locais entre os hepatócitos (FIGURA 16A). Ocasionalmente encontrou-se núcleos picnóticos (FIGURA 16A).

**ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL DO FÍGADO DE
Rhamdia quelen CONTAMINADO COM FOLIDOL® 600**

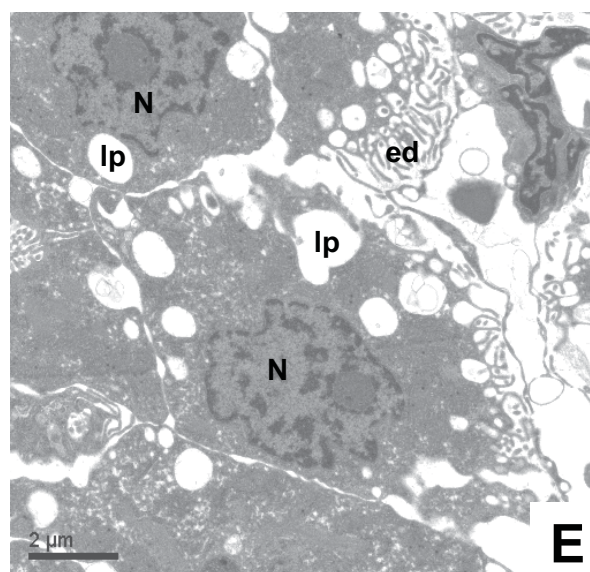
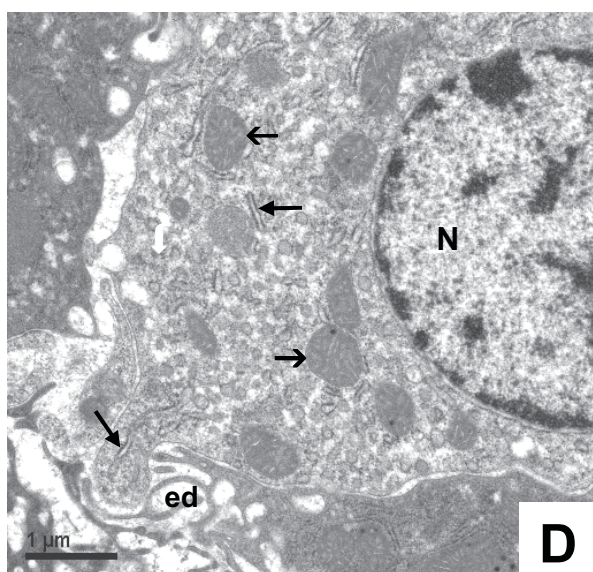
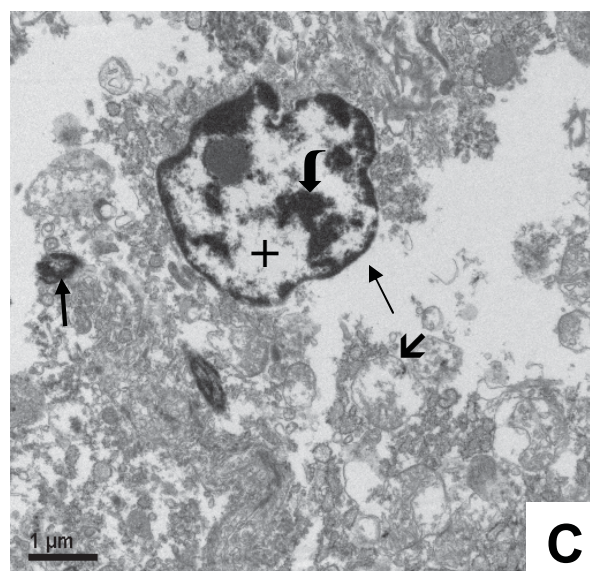
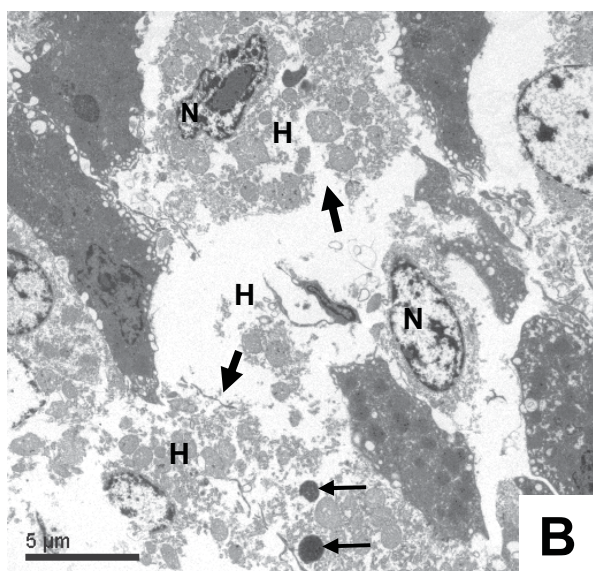
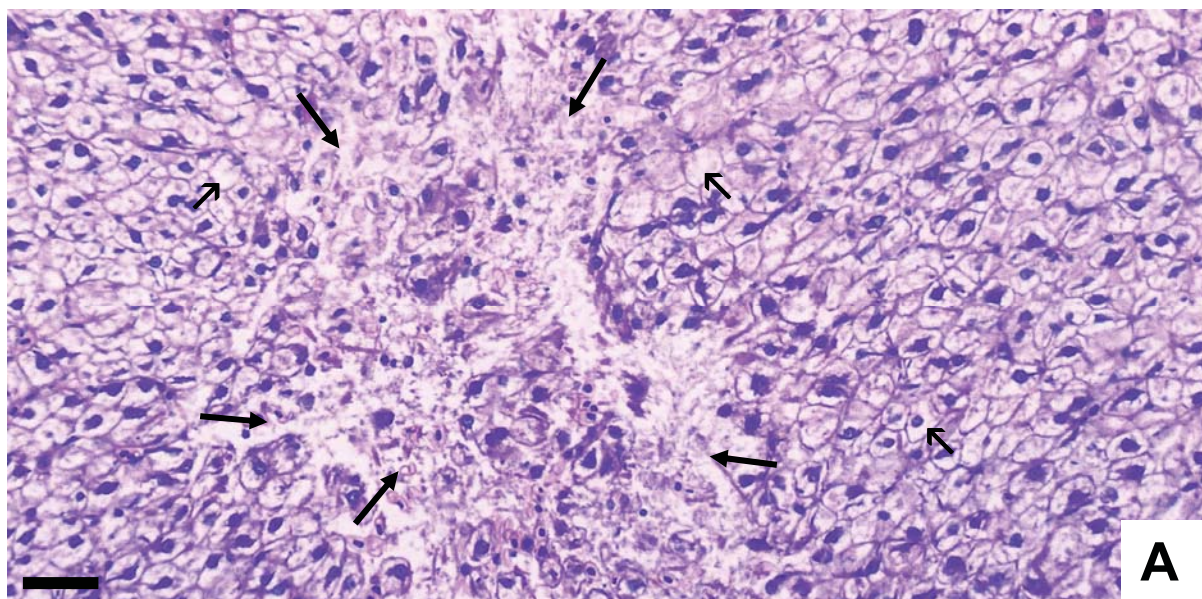


FIGURA 12 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTAMINADO COM FOLIDOL® 600. Tempo de exposição de 4 horas. **A** – Observar hepatócitos com aspecto de vacuolização citoplasmática (↙) e necrose focal (←). Microscopia de luz. Escala: 25 µm. Coloração H.E. **B** – Perda do limite celular (←), grânulos eletrondensos (→), hepatócitos (**H**), núcleo dos hepatócitos (**N**). Microscopia eletrônica de transmissão. **C** - Eucromatina (+), heterocromatização nuclear (↓), rompimento mitocondrial (↙), grânulos eletrondensos (←) e ausência do RER paralelamente em torno do núcleo (←). Microscopia eletrônica de transmissão. **D** – Observar desestruturação do RER (↙), núcleo (**N**), mitocôndrias (↙) e espaço de Disse (**ed**). Microscopia eletrônica de transmissão. **E** – Observar gotículas lipídicas (**lp**), núcleos (**N**) e espaço de Disse (**ed**). Microscopia eletrônica de transmissão.

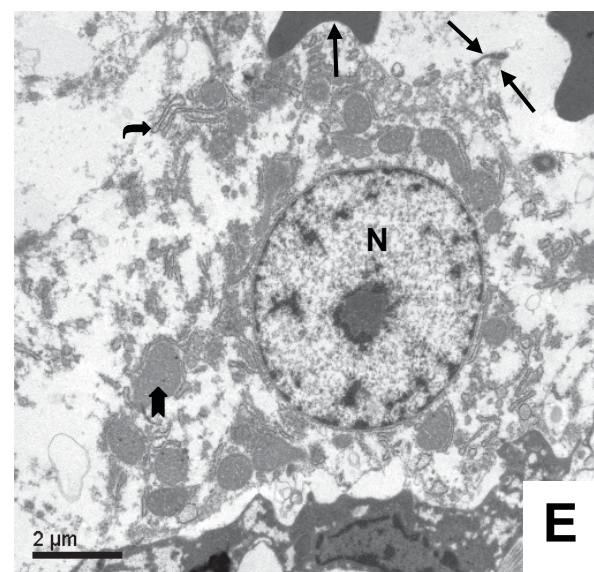
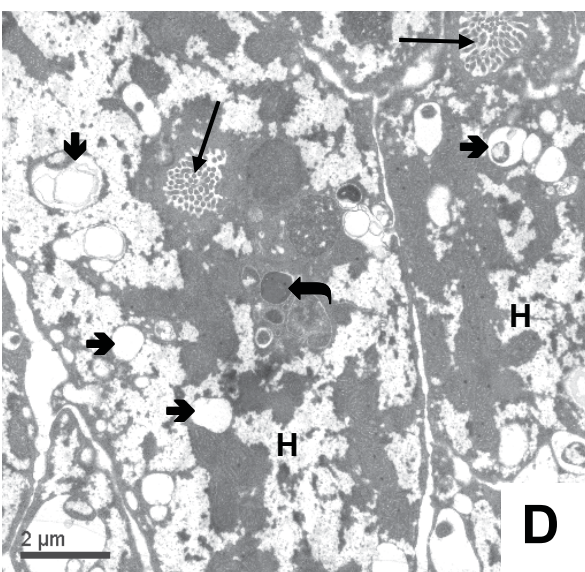
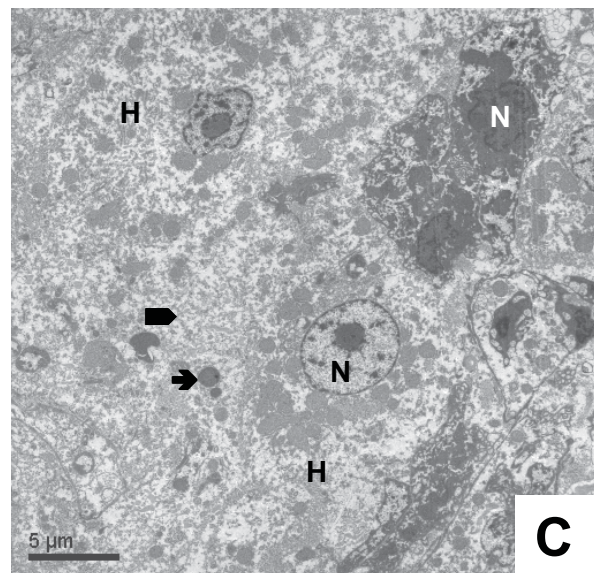
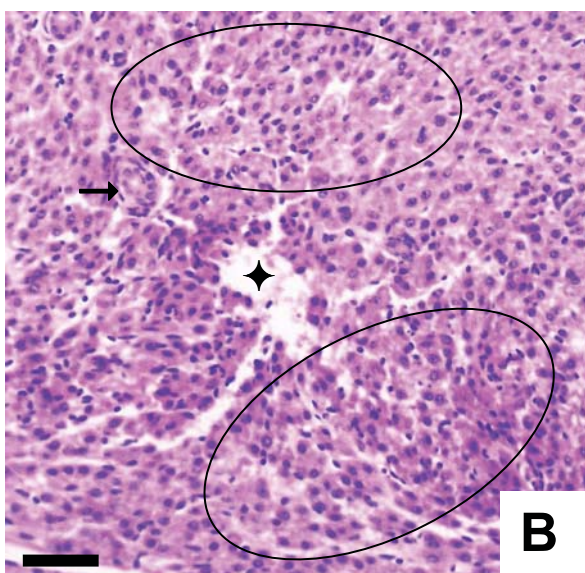
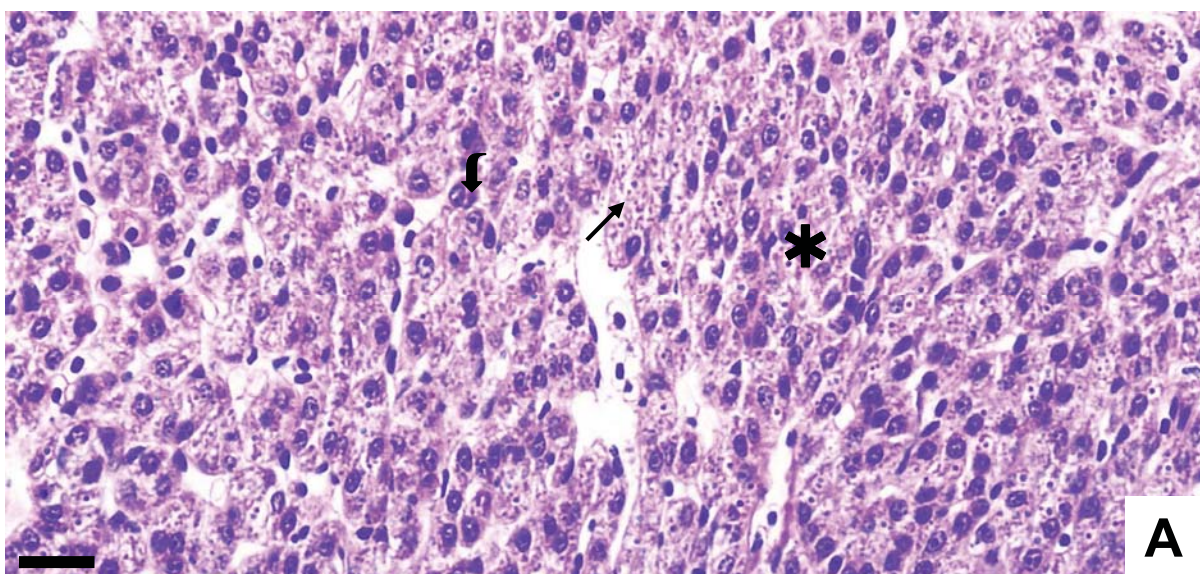


FIGURA 13 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTAMINADO COM FOLIDOL[®] 600. Tempo de exposição de 24 horas. **A** - Observar granulação citoplasmática (↓), perda do contorno celular (→) e parênquima hepático com aspecto pouco vacuolizado (*). Microscopia de luz. Escala: 25 μm. Coloração H.E. **B** - Necrose focal em evidência, vaso sanguíneo com contorno desestruturado (✦), e ducto biliar (→). Microscopia de luz. Escala: 50 μm. Coloração H.E. **C** - Observar núcleo (**N**), grânulo eletrondenso (➔) e perda do contorno celular (►) dos hepatócitos (**H**). Microscopia eletrônica de transmissão. **D** - Observar gotículas lipídicas (➔) nos hepatócitos (**H**), canálculos biliares (→) e grânulo eletrondenso (➔). Microscopia eletrônica de transmissão. **E** - Hepatócito com perda da forma celular (←), desorganização do RER (➔), mitocôndrias (⬆) e núcleo (**N**). Microscopia eletrônica de transmissão.

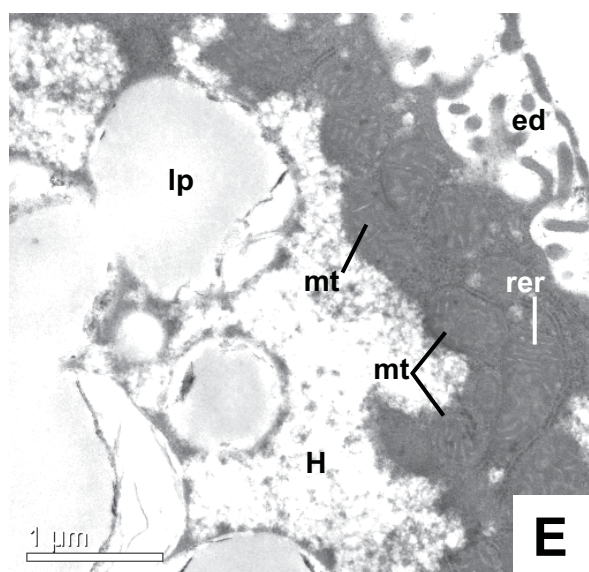
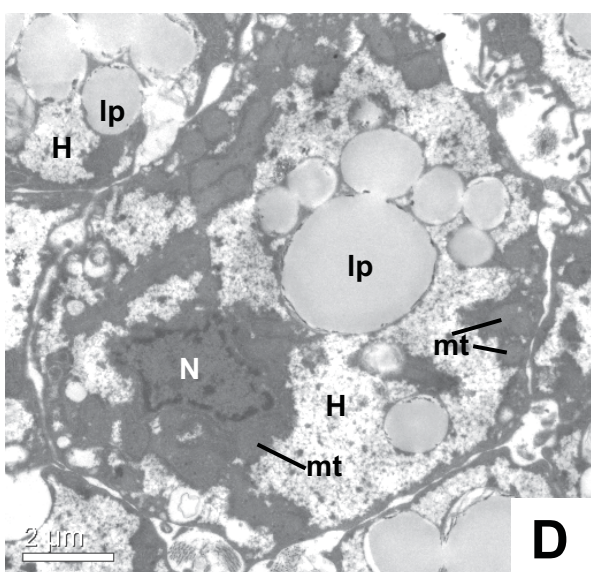
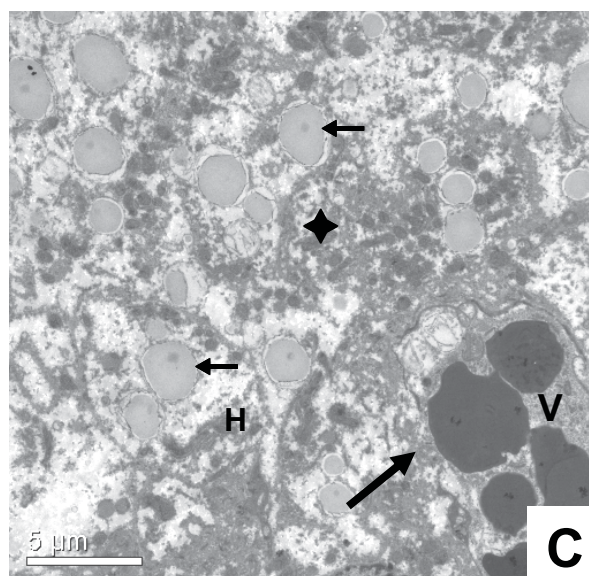
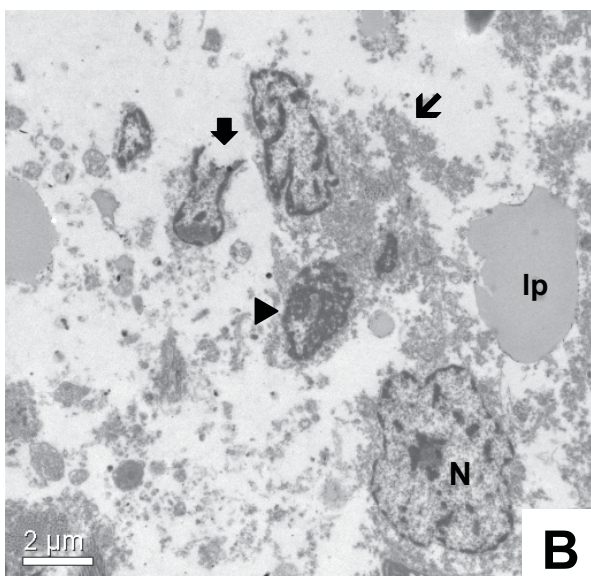
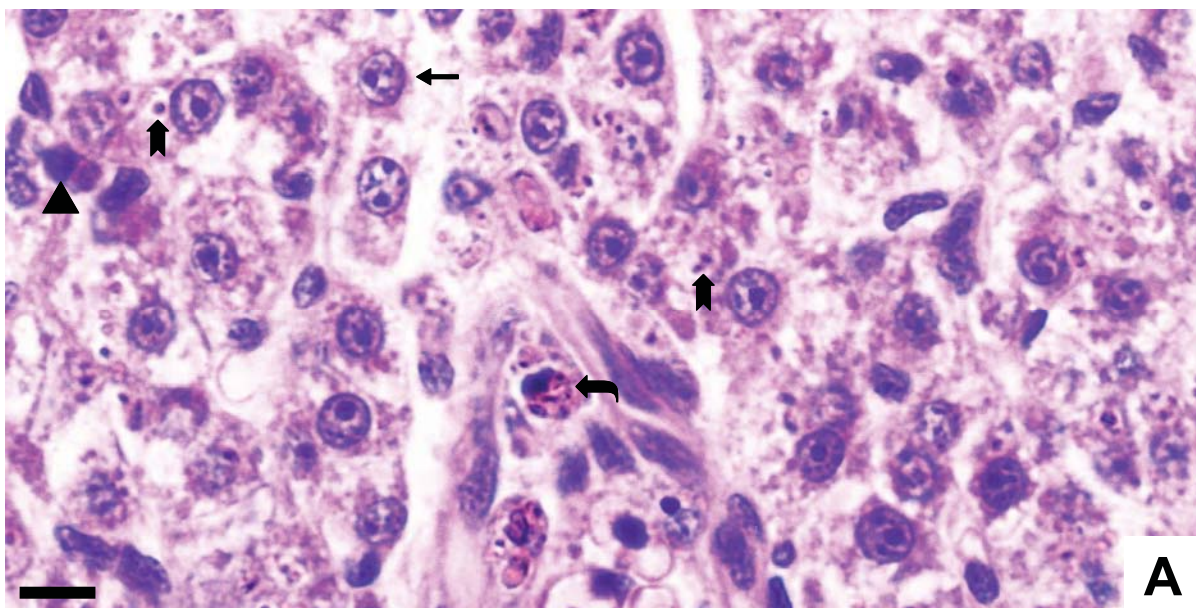


FIGURA 14 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTAMINADO COM FOLIDOL® 600. Tempo de exposição de 48 horas. **A** – Observar pigmentos biliares no citosol (↑), melano-macrófagos livres (↗), núcleo picnótico (▲) e perda do contorno dos hepatócitos (←). Microscopia de luz. Escala: 10 μm. Coloração H.E. **B** – Observar necrose focal com perda do contorno celular (↘), núcleo com aspecto normal (**N**), núcleo picnótico (►), rompimento do contorno nuclear (↓) e gotícula lipídica (**lp**). Microscopia eletrônica de transmissão. **C** – Necrose focal (★), gotículas lipídicas (↗), hepatócito (**H**) e difícil visualização do limite (➡) do vaso sanguíneo (**V**). Microscopia eletrônica de transmissão. **D** – Núcleo (**N**), hepatócitos (**H**) com alta incidência de gotículas lipídicas (**lp**) e mitocôndrias (**mt**). Microscopia eletrônica de transmissão. **E** – Observar hepatócito com mitocôndrias (**mt**) e com RER (**rer**) (ambos originando aspecto menos vacuolizado no hepatócito) e espaço de Disse (**ed**). Microscopia eletrônica de transmissão.

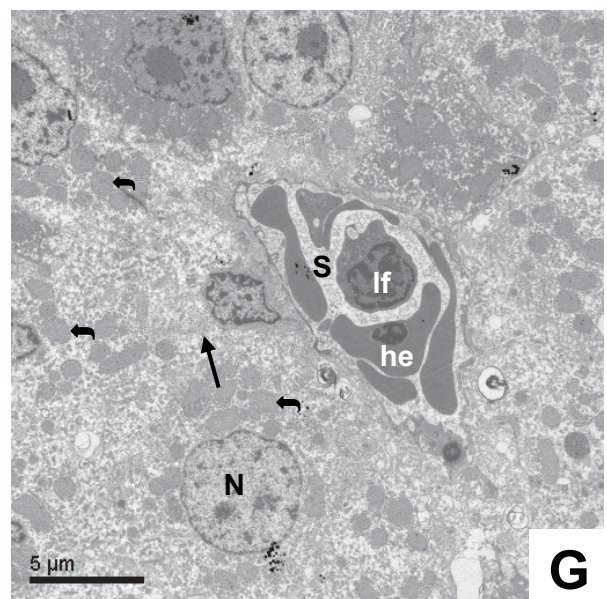
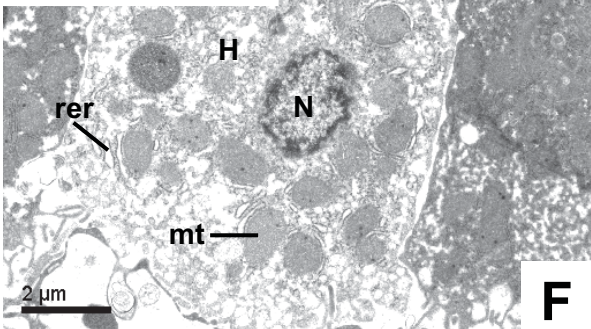
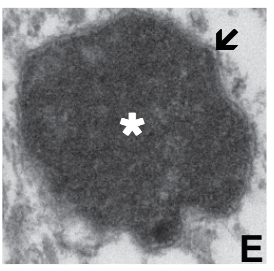
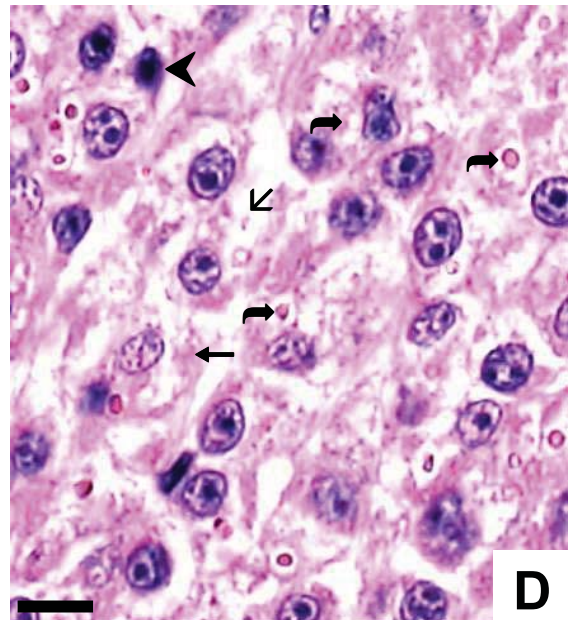
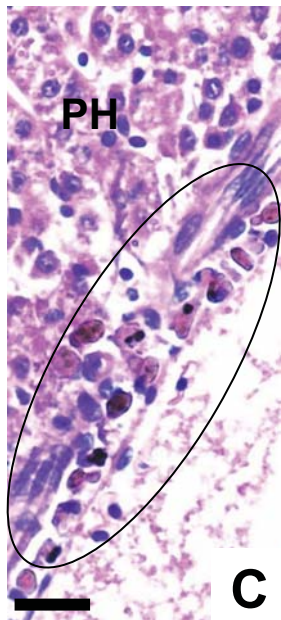
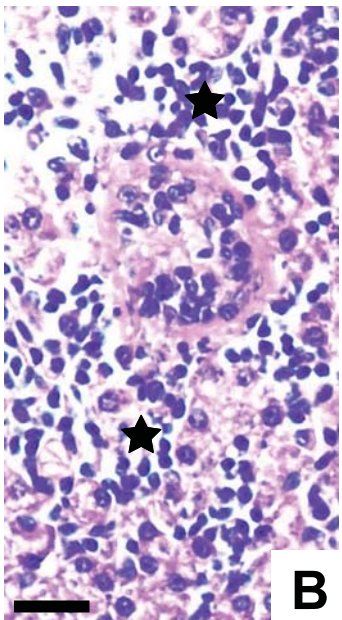
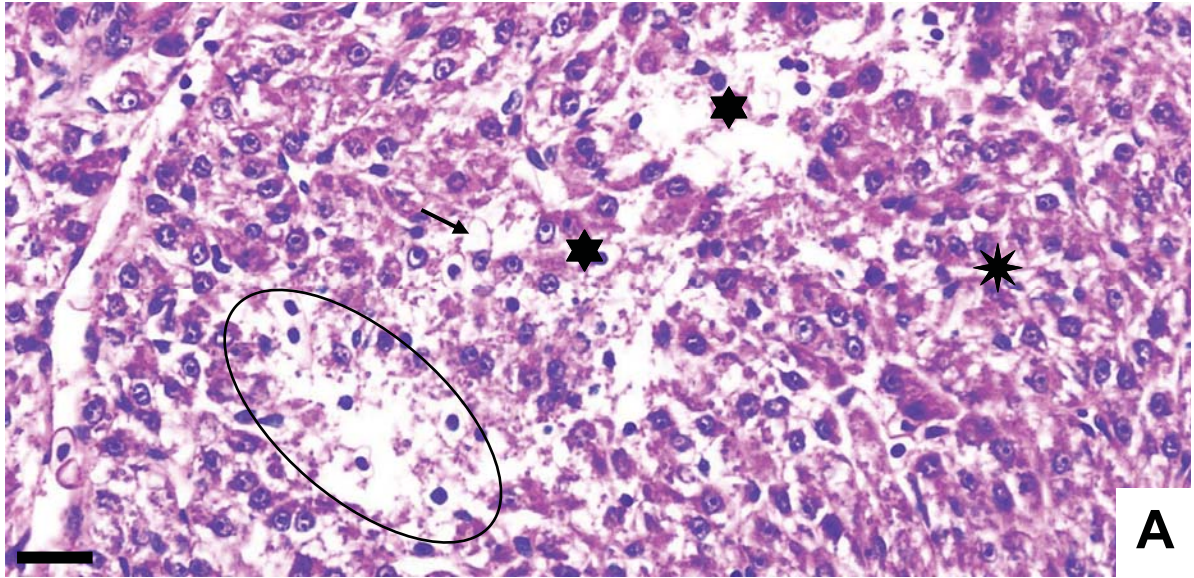


FIGURA 15 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTAMINADO COM FOLIDOL® 600. Tempo de exposição de 72 horas. **A** – Observar em destaque ruptura do contorno de um vaso sanguíneo, vacúolo citoplasmático do hepatócito (↗), tendência do aspecto pouco vacuolizado do citoplasma (*) e necrose focal (★). Microscopia de luz. Escala: 25 µm. Coloração H.E. **B** – Infiltração leucocitária (★). Microscopia de luz. Escala: 25 µm. Coloração H.E. **C** – Parênquima hepático (**PH**) e melano-macrófagos em destaque. Microscopia de luz. Escala: 25 µm. Coloração H.E. **D** - Pigmentos biliares no citosol (↵), perda do contorno celular (←), núcleo picnótico (◀) e granulação intracelular dos hepatócitos (←). Microscopia de luz. Escala: 10 µm. Coloração H.E. **E** - Grânulo eletrondenso (★) envolto por dupla membrana (↘). Microscopia eletrônica de transmissão. **F** - Hepatócito (**H**), canalículo biliar (**cb**), grânulo eletrondenso no citosol (↵), núcleo (**N**), mitocôndria (**mt**), RER desestruturado (**rer**) e gotícula lipídica (**lp**). Microscopia eletrônica de transmissão. **G** - Perda do contorno celular (↗), sinusóide (**S**) com linfócito (**lf**) e hemáceas (**he**), núcleo do hepatócito (**N**), mitocôndrias (↵) e desestruturação do RER. Microscopia eletrônica de transmissão.

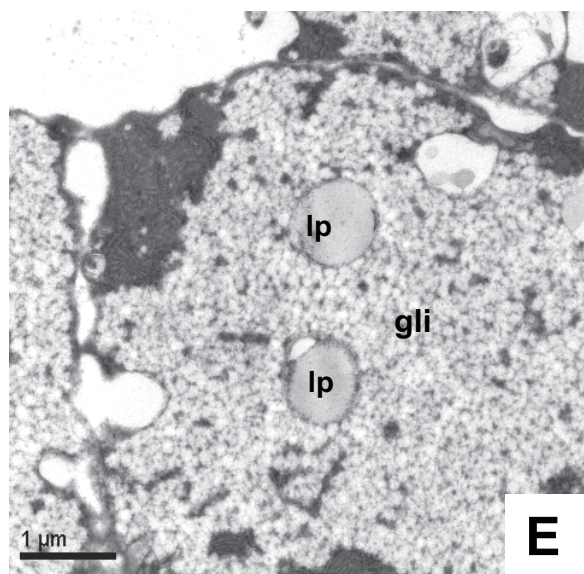
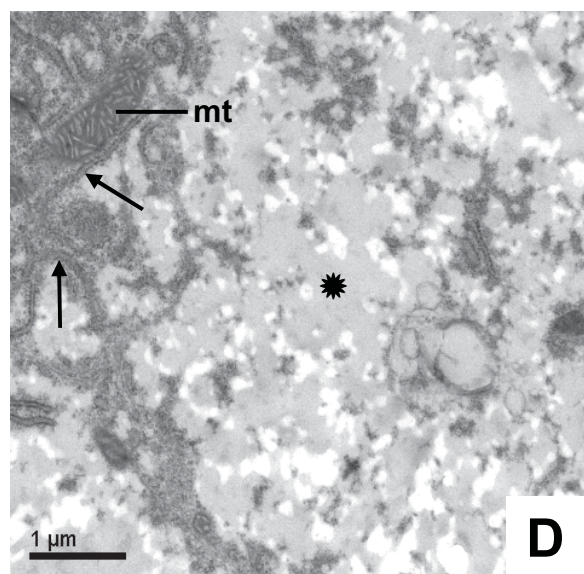
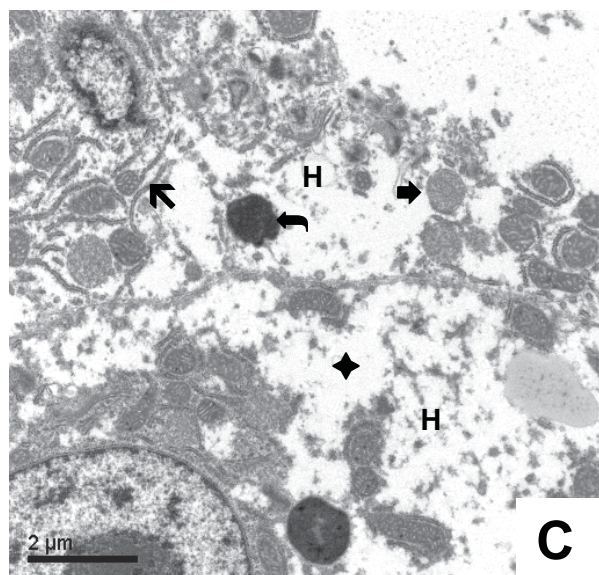
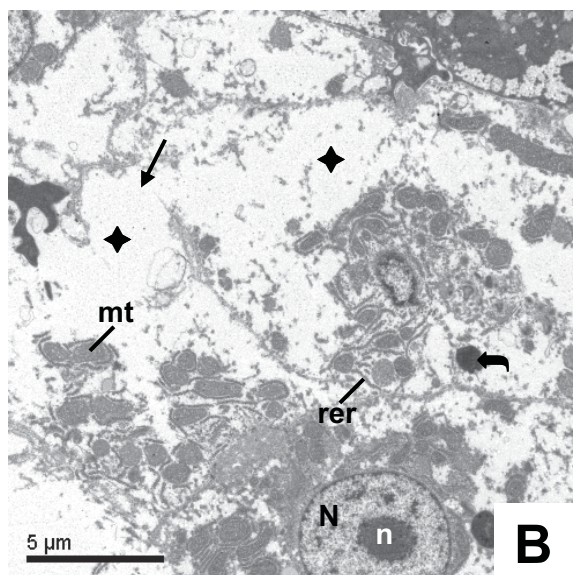
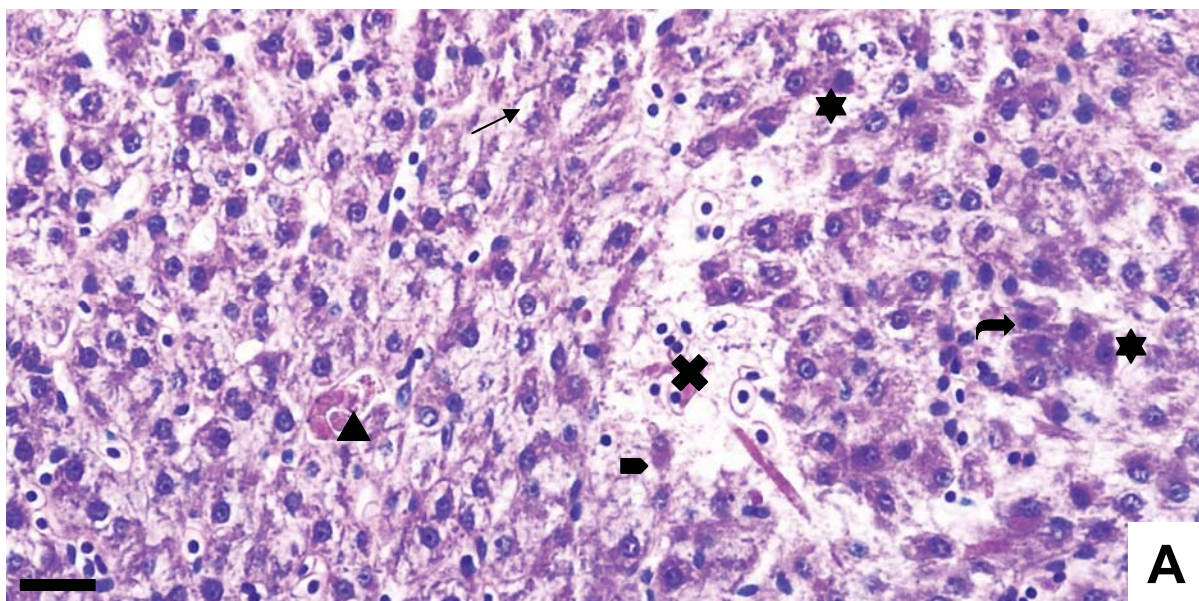


FIGURA 16 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTAMINADO COM FOLIDOL® 600. Tempo de exposição de 96 horas. **A** – Observar hepatócito com vacuolização citoplasmática (↗), região de necrose focal (★), núcleo picnótico (➡), melano-macrófagos no parênquima hepático (▲), vaso sanguíneo com parede desestruturada (✕) e contorno indistinguível dos hepatócitos (►). Microscopia de luz. Escala: 25 µm. Coloração H.E. **B** – Local de perda do contorno do hepatócito (↘), aspecto vacuolizado do citosol (◆), desestruturação do RER (rer), mitocôndria (mt), núcleo (N), nucléolo (n) e grânulos eletrondensos (➡). Microscopia eletrônica de transmissão. **C** – Hepatócito (H), desestruturação do RER (➤), aspecto vacuolizado do citoplasma (◆), grânulos eletrondensos (➡) e mitocôndria (➡). Microscopia eletrônica de transmissão. **D** – Material semelhante a lipídio no citosol (✱), RER desorganizado (↗) e mitocôndria (mt). Microscopia eletrônica de transmissão. **E** – Grânulos semelhante a glicogênio no citosol (gli) e gotícula lipídica no citosol (lp) do hepatócito. Microscopia eletrônica de transmissão.

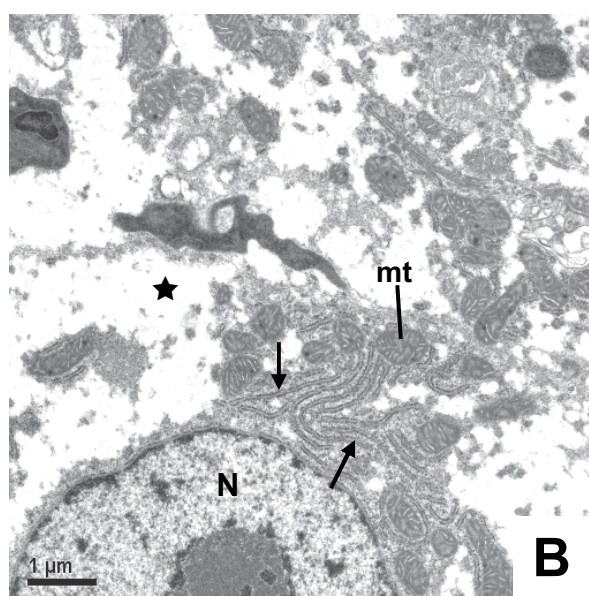
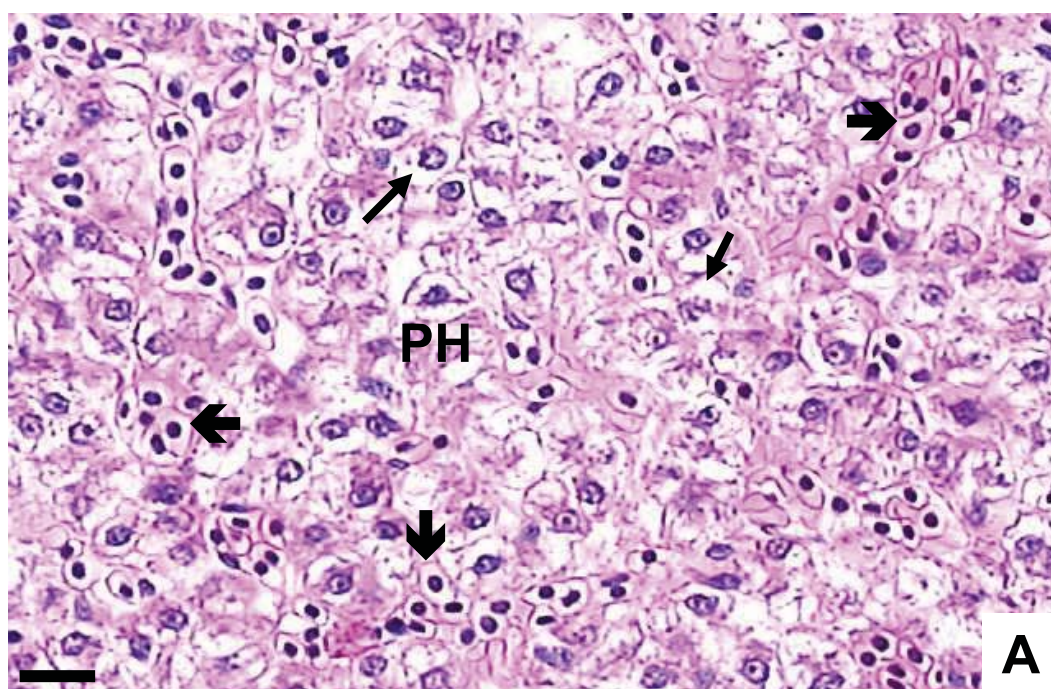


FIGURA 17 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO FÍGADO DE *Rhamdia quelen* CONTAMINADO COM FOLIDOL® 600. Tempo de exposição de 96 horas. **A** – Observar parênquima hepático (**PH**) com hepatócitos vacuolizados (**→**) e congestão sanguínea (**→**). Microscopia de luz. Escala: 25 μ m. Coloração H.E. **B** – Núcleo (**N**), desorganização do RER (**→**), aspecto de vacuolização citoplasmática (**★**) e mitocôndria (**mt**). Microscopia eletrônica de transmissão.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM INDIVÍDUOS DE *Rhamdia quelen* CONTROLE

Foi avaliada a existência ou não de diferença na densidade de melano-macrófagos, densidade de congestão sanguínea, densidade de hepatócitos, densidade de hepatócitos com pigmento biliar e na ocorrência de focos de necrose e de degeneração hidrópica nos tempos de 4hs, 24hs, 48hs, 72hs e 96 horas após o início do experimento, utilizando-se apenas os dados controles.

Não houve diferenças significativas, considerando um nível de significância de 5%, quando analisamos densidade de melano-macrófagos ($P= 0,2067$), densidade de congestão sanguínea ($P= 0,8672$), densidade de hepatócitos com pigmento biliar (G.L.=24, $F= 0,4105$ e $P= 0,799$; homocedasticidade: $P= 0,9079$ e normalidade: $P= 0,486$), densidade de hepatócitos (G.L.=24, $F= 2,402$ e $P= 0,799$; homocedasticidade: $P= 0,4963$ e normalidade: $P= 0,91$) e focos de necrose ($P= 0,8283$). O G.L. foi citado somente para as análises que não utilizaram o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Degeneração hidrópica (ou edema intracelular) não foi encontrada em nenhum dos tempos examinados entre os animais controle e de acordo com os valores atribuídos ao grau de ocorrência para esta alteração, encontramos o valor (0) inalterado em todos os tempos analisados.

Após a constatação de que os animais controle não diferiam significativamente entre si em todas as alterações avaliadas em relação aos tempos examinados, separou-se aleatoriamente desta população, 10 indivíduos formando um único grupo controle.

4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM INDIVÍDUOS DE *Rhamdia quelen* CONTAMINADOS COM FOLIDOL® 600

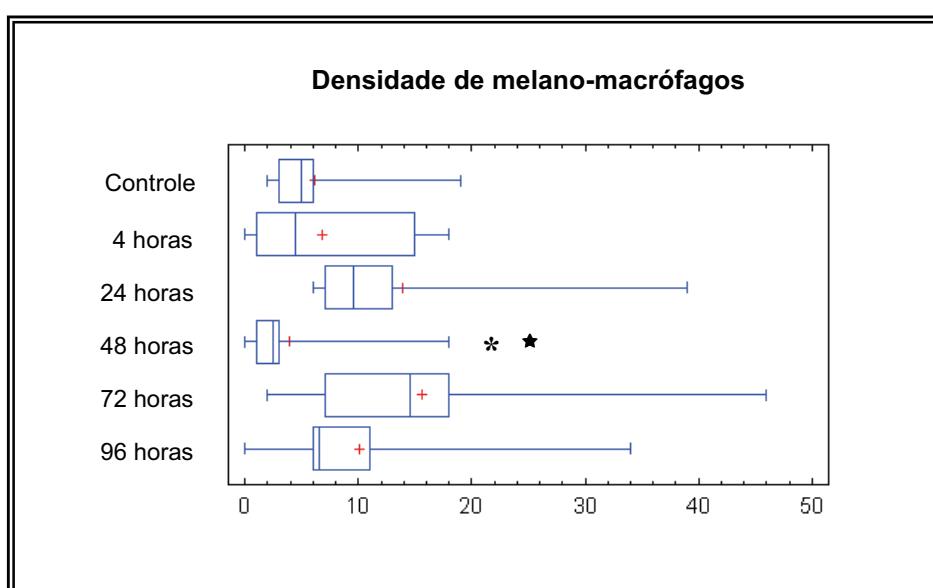
Foram analisados os mesmos parâmetros verificados no grupo controle (descrito no item 4.4) de indivíduos contaminados com Folidol® 600 nos tempos analisados comparados com a amostra controle e experimentais entre si.

4.5.1 Melano-macrófagos

Considerando um nível de significância de 5%, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis constatou que a densidade de melano-macrófagos no fígado difere nos diferentes tempos experimentais e na amostra controle ($P=0,0116$).

Através do teste de comparações múltiplas, o número de melano-macrófagos presentes nos fígados dos animais expostos a 48 horas de contaminação foi menor ($P<0,05$) que naqueles expostos por 24 e 72 horas. Nos demais grupos, não houve diferença significativa (FIGURA 18).

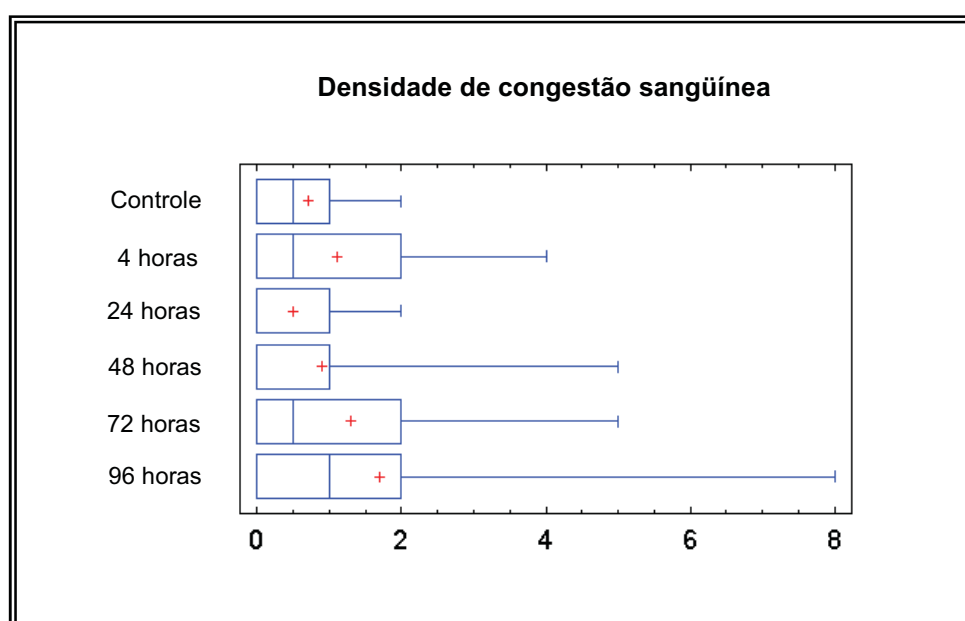
FIGURA 18 - Densidade de melano-macrófagos no fígado de indivíduos de *R. quelen* provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais. Estatística: * = $P<0,05$ em relação ao grupo experimental 24 horas. ★ = $P<0,05$ em relação ao grupo experimental 72 horas. (┆ = mediana).



4.5.2 Congestão Sanguínea

Considerando um nível de significância de 5%, o teste de Kruskal-Wallis constatou que a densidade de congestão sanguínea no fígado não difere nos diferentes tempos experimentais em relação a amostra controle ($P= 0,8209$). Em 4 horas, foi observado 1,1 ($\pm 1,45$) de congestão sanguínea, em 24 horas encontramos 0,5 ($\pm 0,71$) de congestão sanguínea, em 48 horas observamos 0,9 ($\pm 1,73$) de congestão sanguínea, em 72 horas foi observado 1,3 ($\pm 1,83$) de congestão sanguínea e em 96 horas foi encontrado 1,7 ($\pm 2,54$) de congestão sanguínea. Na amostra controle encontramos 0,7 ($\pm 0,82$) de congestão sanguínea (FIGURA 19).

FIGURA 19 - Densidade de congestão sanguínea no fígado de indivíduos de *R. quelen* provenientes da amostra controle e dos grupos experimentais. (\perp = mediana).



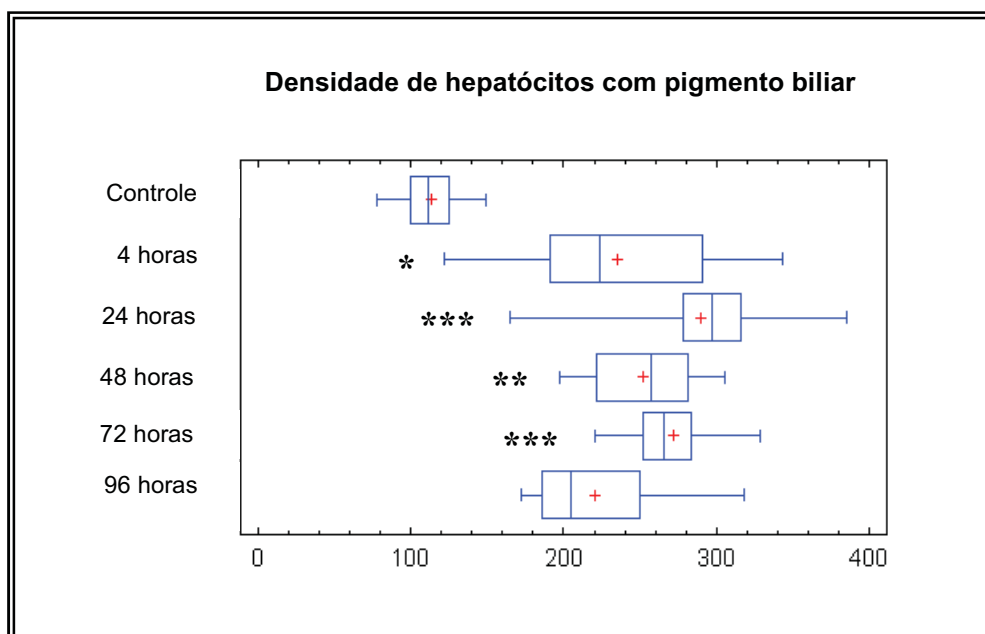
4.5.3 Hepatócitos com Pigmento Biliar

Considerando um nível de significância de 5%, o teste de Kruskal-Wallis constatou que a densidade de hepatócitos com pigmento biliar difere nos diferentes tempos experimentais e na amostra controle ($P<0,0001$).

Através do teste de comparações múltiplas (teste de Dunnett's) nos peixes expostos ao contaminante por 4 horas ($P<0,05$), 24 horas ($P<0,001$), 48 horas

($P < 0,01$) e 72 horas ($P < 0,001$) o número de hepatócitos contendo pigmento biliar foi maior que no grupo controle. Após 96 horas não foi verificada diferença significativa (FIGURA 20).

FIGURA 20 - Densidade de hepatócitos com pigmento biliar de indivíduos de *R. quelen* provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais. Estatística: * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$ em relação a amostra controle. (┘ = mediana).

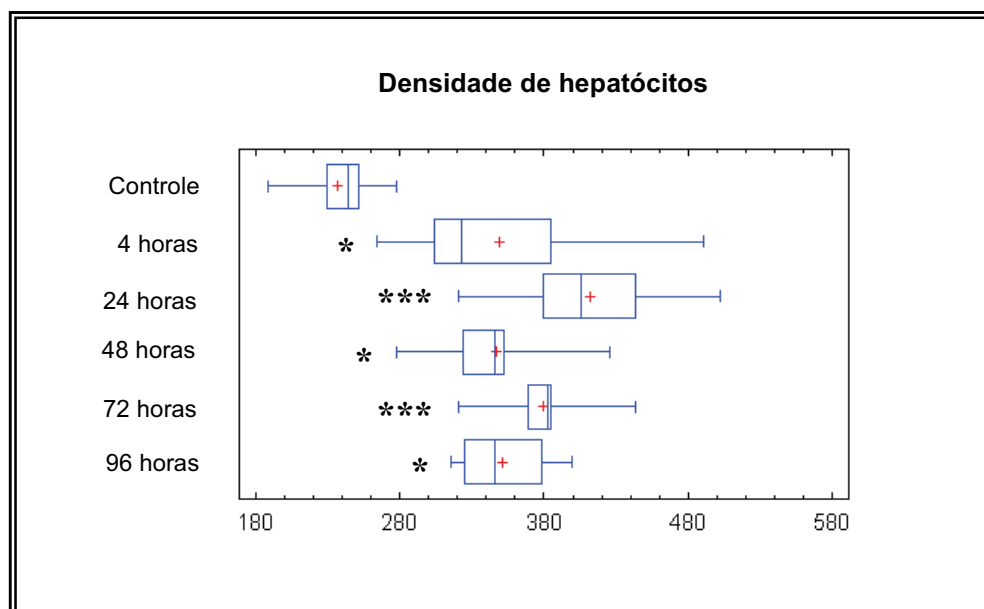


4.5.4 Densidade de Hepatócitos

Considerando um nível de significância de 5%, o teste de Kruskal-Wallis constatou que a densidade de hepatócitos difere nos diferentes tempos experimentais e na amostra controle ($P < 0,0001$).

Através do teste de comparações múltiplas (teste de Dunnett's) podemos concluir que o número de hepatócitos coletado na amostra controle difere do coletado em 4 horas ($P < 0,05$), em 24 horas ($P < 0,001$), em 48 horas ($P < 0,05$), em 72 horas ($P < 0,001$), e em 96 horas ($P < 0,05$) (FIGURA 21).

FIGURA 21 - Densidade de hepatócitos de indivíduos de *R. quelen* provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais. Estatística: * = $P < 0.05$ e *** = $P < 0.001$ em relação a amostra controle. (┆ = mediana).



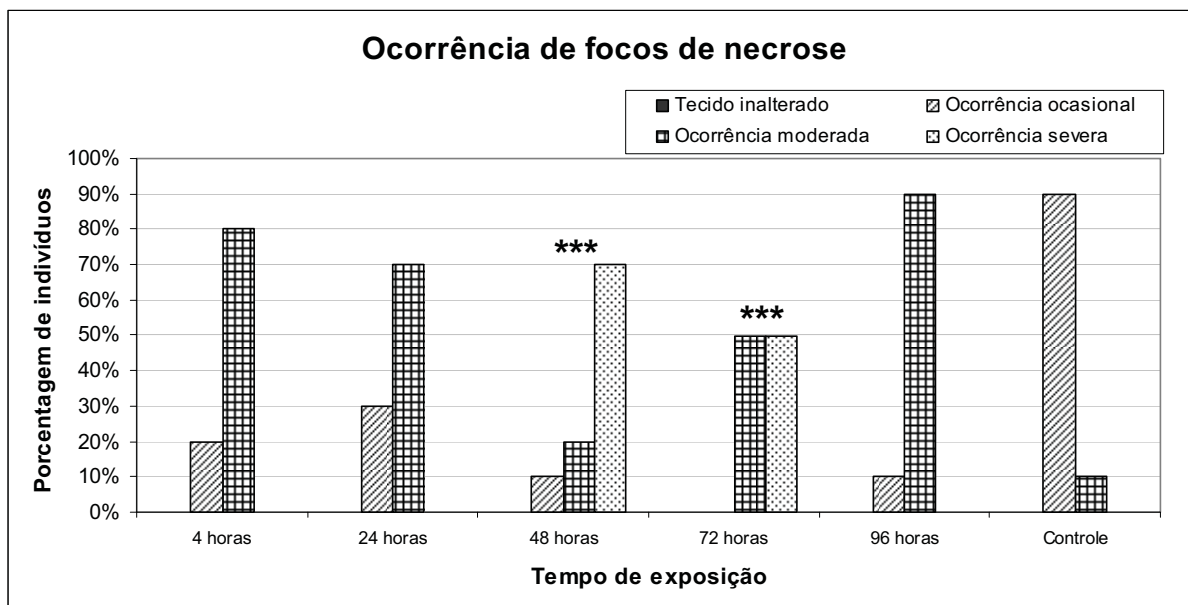
4.5.5 Focos de Necrose

Considerando um nível de significância de 5%, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis constatou que a ocorrência de focos de necrose no fígado difere nos diferentes tempos experimentais e na amostra controle ($P < 0,001$).

Através do teste de comparações múltiplas (teste de Dunnett's) a ocorrência de focos de necrose observada na amostra controle difere da observada em 48 horas ($P < 0,001$) e em 72 horas ($P < 0,001$) (FIGURA 22).

De acordo com os parâmetros de análise atribuídos à focos de necrose, observamos que nas primeiras 24 hs de exposição houve um predomínio de ocorrência moderada de focos de necrose entre os indivíduos. Após 48 hs de exposição verificou-se o aparecimento de ocorrência severa enquanto que após 96 hs de exposição, foi observado predomínio de ocorrência moderada de focos de necrose. Já, na amostra controle a ocorrência ocasional de focos de necrose predominou entre os indivíduos.

FIGURA 22 - Ocorrência de focos de necrose no fígado de indivíduos de *R. quelen* provenientes da amostra controle e indivíduos provenientes de grupos experimentais. Estatística: *** = diferença significativa ($P < 0,001$) em relação a amostra controle.



4.5.6 Degeneração Hidrópica

A ocorrência de degeneração hidrópica (ou edema intracelular) não foi encontrada no parênquima hepático dos peixes experimentais e controle. O tecido hepático mostrou-se inalterado quando nos referimos a esta alteração.

5 DISCUSSÃO

Para o presente estudo, procurou-se utilizar um organofosforado (OP) empregado rotineiramente na agricultura do estado do Paraná, o Folidol[®] 600 que possui o Paration metílico como princípio ativo. É considerado um produto extremamente tóxico pela empresa formuladora. A espécie de peixe estudada, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824), apresentou-se como um ótimo organismo experimental, devido à facilidade de obtenção e de manutenção em condições laboratoriais e por ser uma espécie nativa de grande interesse comercial e muito abundante nos rios do estado do Paraná.

Existem na literatura inúmeros trabalhos enfatizando os efeitos toxicológicos do Folidol[®] 600 em organismos vivos (AGUIAR et al., 2004; BASTOS et al., 1998; CABRINI, 1992; CAVERO, 1985; CAVERO et al., 1976; FANTA et al., 2003; 1976; FONSECA, 2002; JOKANOVIĆ, 2001; LANGENBACH, 1999; MACHADO & FANTA, 2003; MAZON & FERNANDES, 1999; OGA, 1996; PAYNE et al., 1996; RICHMONDS & DUTTA, 1992; RODRIGUES & FANTA, 1998; ROEX et al., 2003; SILVA et al., 1993; SAMUEL & SASTRY, 1989; SILVA FILHO, 2000; STURM et al., 1999; THANGNIPON et al., 1995). No entanto, há a necessidade de novos trabalhos, devido a grande variabilidade de resultados obtidos, já que cada espécie vive em um ecossistema determinado, integrada com o mesmo, respondendo de forma específica a substâncias tóxicas presentes no meio.

Na determinação da dose subletal do OP Folidol[®] 600 neste estudo para *R. quelen*, doses entre 0,04 mL a 0,02 mL por litro de água, provocaram a morte de todos os peixes em 24 horas de experimento. MOREIRA (1998) encontrou doses semelhantes para *Oreochromis niloticus*.

A dose de 0,01 mL por litro de água de Folidol[®] 600 para *R. quelen* foi considerada subletal em 96 horas. Em *O. niloticus*, esta dose também não provocou mortes em 96 horas com a ação do mesmo poluente (MOREIRA, 1998). Há uma similaridade de sensibilidade para ambas as espécies. Já, no peixe de água doce *Corydoras paleatus*, a dose de 0,00097 mL por litro de água de Folidol[®] 600 foi subletal para a espécie (FANTA et al., 2003). MORAES (2003), verificou que doses variando de 0,0005 a 0,007 mL por litro do OP Folidol[®] 600 são subletais para o

peixe *Brycon cephalus* (matrinxã) em experimento estático de 4 horas de duração enquanto que RODRIGUES & FANTA (1998) determinaram a dose subletal para *Brachydanio rerio* a de 0,000025 mL por litro do OP Paration metílico.

As informações citadas acima sugerem que as espécies reagem de maneira diversa a um mesmo poluente, possuindo maior ou menor resitência ao mesmo. É importante o estudo da determinação de doses subletais, pois essas doses aproximam-se mais da realidade informando o nível de contaminação das águas pelos organofosforados os quais podem causar efeitos adversos em organismos não-alvo como os peixes.

Para MACHADO & FANTA (2003), doses subletais são insignificantes diante das doses recomendadas para a aplicação na lavoura, presentes no rótulo dos produtos. Para combater algumas pragas que atacam a cultura do tomate, por exemplo, recomenda-se 1 mL para cada litro de água do organofosforado Mentox 600 (Paration metílico). A mesma concentração é recomendada também do OP Folidol[®] 600 (Paration metílico) para combater pragas que atacam as culturas da batata, do alho e da cebola (SEAB, 2002). Segundo os autores, este volume, caso eventualmente venha a contaminar um curso d'água, estará bastante diluído. Assim mesmo, a diferença entre as concentrações merece reflexão. Considera-se importante analisar os efeitos de doses subletais de um produto comercial como o Folidol[®] 600 em peixes, o que se aproxima mais da realidade, podendo-se estabelecer procedimentos de controle de contaminação das águas.

Testes de toxicidade em peixes são feitos geralmente com espécies exóticas. *Brachydanio rerio*, é um exemplo, sendo uma espécie modelo usada pela legislação brasileira em testes de toxicidade aguda para regular e classificar os pesticidas usados no Brasil. A CL₅₀ é o valor utilizado para classificação toxicológica de agrotóxicos em geral. Contesta-se, portanto, a generalização dos dados geradores com esta espécie em testes de toxicidade aguda para a determinação da CL₅₀ para peixes em geral. Diante desta problemática, enfatiza-se a importância de testes de toxicidade com espécies nativas, como no presente estudo com *R. quelen*, e outros como *C. paleatus* (FANTA et al., 2003) e *B. cephalus* (MORAES, 2003), os quais ilustram bem este problema.

Um dos procedimentos mais adequados para o estudo dos efeitos tóxicos de drogas em peixes é, sem dúvida, a análise das alterações que o animal pode sofrer

em nível celular ou subcelular, pois os primeiros efeitos de contaminantes geralmente ocorrem nesses níveis (FANTA et al., 2003; PICKERING, 1981). Após os danos celulares, uma seqüência de patologias são observadas em peixes, comprometendo a sobrevivência e conseqüentemente a estrutura da população, afetando o ecossistema (FANTA et al., 2003).

Para BERNET et al. (1999) e HINTON et al. (1992), a histologia é um método eficiente para detectar efeitos de descarga de resíduos industriais, agrícolas e domésticos, especialmente para o estudo de efeitos subletais, em vários tecidos e órgãos. Para WESTER & CANTON (1991), a histologia é um parâmetro bastante sensível, que apresenta resultados confiáveis e que podem ser utilizados como base para outros estudos. TEH et al. (2005) sugerem a histopatologia como biomarcador apropriado e válido para investigações com teleóstes de água doce.

MELA (2004) sugeriu que o estudo histopatológico pode colaborar com o diagnóstico da saúde do indivíduo, objetivando a identificação da presença de danos irreversíveis ao organismo o que poderia levar à morte dos mesmos ou colocar em risco a extinção da espécie. RODRIGUES et al. (2001) sugere ainda que o estudo das alterações sintomatológicas e da histopatologia em peixes expostos a pesticidas é vital para a saúde pública e que é necessário investigar os efeitos dos OPs em organismos expostos quando doses subletais estão envolvidas.

O fígado é considerado de grande interesse para a investigação de impactos ambientais, sendo considerado um órgão marcador de poluição aquática, pois tem grande papel no metabolismo e subseqüente excreção de xenobióticos (BERNET et al., 1999). GÜL et al. (2004) sugerem que a poluição da água é capaz de induzir alterações histológicas no fígado, as quais podem causar disfunções fisiometabólicas em peixes. De acordo com GILL et al. (1988) e RODRIGUES et al. (2001), o fígado é um órgão que freqüentemente exhibe mudanças quando exposto a pesticidas em doses subletais.

A quantificação das alterações histológicas neste trabalho permitiu uma avaliação mais precisa das lesões causadas pela dose subletal de Folidol® 600 para o fígado de *R. quelen* e, conseqüentemente, para o organismo do peixe. Segundo BERNET et al., (1999), a quantificação das lesões em uma investigação histopatológica, torna a avaliação estatística praticável. Entretanto, ele acrescenta

que a descrição morfológica das lesões é essencial e pode ser somada aos métodos de quantificação.

A análise histopatológica dos animais intoxicados com Folidol® 600 mostrou que o parênquima hepático é alvo da ação tóxica desse produto. O aumento na densidade dos hepatócitos nas primeiras 96 horas experimentais foi a alteração mais freqüente. Possivelmente este fato esteja ligado aos mecanismos que regulam a proliferação celular (multiplicação celular) dos hepatócitos e a uma maior incidência de necrose levando a morte celular e induzindo o aumento da multiplicação dos hepatócitos. Segundo ROBERTS (1989) a necrose pode ser caracterizada por alterações nucleares e citoplasmáticas, seguidas de perda dos limites celulares. Ao ocorrer necrose de uma célula há liberação de sinalizadores que induzem a proliferação celular para a substituição das células mortas para retornar a condição estrutural e funcional do tecido.

Outro fator que poderia ser associado ao aumento na densidade dos hepatócitos é o aumento nas reações de detoxicação realizadas pelas células hepáticas devido a absorção do Folidol® 600 pelo organismo de *R. quelen*. Há um aumento no número de hepatócitos com o objetivo de solucionar o problema. GÜL et al. (2004) investigando a histopatologia hepática em peixe de água doce de áreas poluídas observou extensa proliferação de hepatócitos e sugeriu que essa alteração foi indicativo da ação tóxica de poluentes.

Poucos estudos sobre o aumento na densidade dos hepatócitos e as respostas celulares associadas têm sido realizados em peixes de água doce brasileiros, principalmente em relação ao efeito de contaminantes.

Segundo JOKANOVIC (2001), a detoxicação ou degradação de OPs inclui a biotransformação dos mesmos para metabólitos não-tóxicos sendo a reação mais significativa no metabolismo dos compostos OPs no organismo vivo. Mesmo que a soma dos metabólitos formados nessa reação seja baixa, isso pode ser muito significativo quando analisamos o aspecto toxicológico. Para LU (1996), a biotransformação pode ser considerada um mecanismo de detoxificação pelo organismo, mas em certos casos os metabólitos são mais tóxicos do que os compostos não metabolizados.

A densidade de hepatócitos com pigmento biliar foi outra alteração evidenciada neste estudo, sendo caracterizada por grânulos amarelo-marrons no

citoplasma dos hepatócitos. Este aumento foi significativo nas primeiras 72 horas experimentais. Já em 96 horas de exposição observamos uma diminuição na densidade de hepatócitos com pigmento biliar em relação a todos os tempos experimentais examinados. No entanto, observamos que, em relação ao controle, a densidade de hepatócitos com pigmento biliar neste tempo de exposição foi ainda relativamente alta.

Provavelmente a absorção do Folidol[®] 600 pelo organismo de *R. quelen* e consequente danos em estruturas celulares responsáveis pela secreção, fez com que a bile secretada pelos hepatócitos permanecesse no interior das células não sendo liberada para o trato digestório. Este fato também foi confirmado pelas avaliações de FANTA et al. (2003), analisando o fígado de *C. paleatus* contaminado com Folidol[®] 600 e PACHECO & SANTOS (2002) estudando os efeitos de diferentes contaminantes ambientais no fígado de *Anguilla anguilla*. Os autores encontraram nos hepatócitos dos indivíduos expostos aos poluentes alta incidência de grânulos amarelo-marrom sugerindo estagnação da bile.

VERLAG (1982) observou que a estagnação da bile leva a formação de grânulos amarelos amarronzados no interior das células, ressaltando que estes grânulos são facilmente identificados em preparados de lâminas permanentes de fígado coradas com H.E. Este tipo de observação foi descrito também por TAKASIMA & HIBIYA (1995) analisando o fígado de trutas não contaminadas.

Ultraestruturalmente observamos que os grânulos eletrondensos no citosol dos hepatócitos de *R. quelen* que foram identificados envoltos por dupla membrana possivelmente são pigmentos biliares no interior de lisossomos. Segundo WOLKE (1992), o pigmento ferro está presente na forma armazenada com a proteína apoferritina e é conhecido como hemosiderina, sendo que este pigmento pode estar no interior de lisossomos ou livres no citosol. Esses grânulos ultraestruturalmente eletrondensos no citosol de *R. quelen* experimental encontrado em alta incidência no presente trabalho apresentou as mesmas características mostrada por WELSCH (1999) e que o autor descreve como sendo corpos lisossômicos com pigmentos biliares.

As células chamadas melano-macrófagos (MMs) assemelham-se ultraestruturalmente a macrófagos, contém alta quantidade dos pigmentos tipo-melanina, lipofucsina e hemosiderina e agem no metabolismo de compostos tóxicos

(AGIUS, 1980; MESEGUER et al., 1994; MIZUNO et al., 2002). Embora haja grande variação interespecífica, aparentemente a melanina é mais abundante nos centros de melano-macrófagos (CMMs) do baço e do rim, sendo que no fígado há grande quantidade de hemosiderina. Os CMMs são acumulações focais de macrófagos usualmente contendo os pigmentos de hemosiderina, lipofuscina, ceróides e melanina que possuem a função em processos fisiológicos normais de defesa do organismo frente a agentes nocivos (WOLKE, 1992). Os MMs, livres ou em grupos pequenos, são histologicamente similares às células dos CMMs (MESEGUER et al., 1994).

A hemosiderina é um pigmento contendo ferro formado a partir da hemoglobina devido a degradação de eritrócitos, e o produto dessa quebra gera grandes quantidades de hemosiderina (NOREÑA-BARROSO et al., 2004; RIOS, 2001; THIYAGARAJAH et al., 1998).

Vários autores tem analisado em nível histopatológico a causa da presença dos MMs e dos CMMs, correlacionando estes com os poluentes ambientais (HAAPARANTA et al., 1996; MELA, 2004; RABITTO et al., 2005; WOLKE, 1992) e a privação de alimento (AGIUS & ROBERTS, 1981; RIOS, 2001). HARTLET et al. (1996) propôs a utilização de melano-macrófagos como bioindicador da degradação ambiental e da poluição de ambientes naturais.

Não observamos neste presente estudo a presença de CMMs no fígado. Em nossas análises encontramos melano-macrófagos (MMs) isolados ou agrupados, mas não em agregados caracterizando os CMMs distribuídos pelo parênquima hepático. Não houve diferença significativa na densidade dessas células entre os indivíduos experimentais e a amostra controle. O experimento agudo realizado neste trabalho expondo *R. quelen* a um curto período de tempo ao Folidol[®] 600 não permitiu a formação dos CMMs e de grandes quantidades de CMMs que teriam a função de defesa do tecido hepático frente ao poluente.

No fígado, agentes lesivos de natureza química freqüentemente causam necroses focais, isto devido a concentração de xenobióticos durante o processo de detoxificação desempenhada por este órgão. Estas necroses focais dificilmente vão levar a perda estrutural e funcional do órgão devido a alta potencialidade regenerativa do tecido epitelial deste órgão (ROBERTS, 1989).

A ocorrência de focos de necrose observada no fígado de *R. quelen* exposto ao Folidol® 600 aumentou significativamente nos tempos de 48 h e 72 horas experimentais em relação à amostra controle. Observou-se que nos outros tempos experimentais houve presença moderada de focos de necrose. No tempo de 48 horas experimental encontramos prodomínio de ocorrência severa de focos de necrose. Já, nos indivíduos controle, observou-se que a grande maioria dos indivíduos apresentaram ocorrência ocasional de focos de necrose.

Sugerimos que o aumento significativo na ocorrência de focos de necrose em *R. quelen* nos tempos de 48 hs e 72 horas de exposição pode estar relacionado com a presença do Folidol® 600. A necrose ainda pode indicar degeneração de proteínas estruturais na membrana dos hepatócitos, podendo trazer problemas teciduais, pois segundo PACHECO & SANTOS (2002) as proteínas estruturais de membrana é que comumente mantém o parênquima hepático como um tecido compacto e homogêneo. A alta incidência de ocorrência moderada e severa de focos de necrose encontrada nos tempos experimentais provavelmente trará aos indivíduos problemas metabólicos, celulares e subcelulares.

A presença de focos de necrose também foi observada por FANTA et al. (2003) e SILVA (1989) em estudos com o Folidol® 600, DUTTA et al. (1993) com OP Malation, RODRIGUES et al. (2001) com o OP Dipterex 500® e GÜL et al. (2004) com poluentes ambientais. RODRIGUES & FANTA (1998) analisando o efeito do OP Dimetoato 500 no fígado de *B. rerio*, encontraram áreas totalmente necrosadas em 24 horas de exposição, inclusive com hemorragia a partir de capilares, não sendo mais possível a visualização dos limites de vasos e de células do tecido hepático adjacente. GILL et al. (1988) encontraram necroses focais no fígado do peixe *Puntius conchoni* após 30 dias de exposição em alta concentração (0,306 mg/L) do inseticida Carbaril.

Nos focos de necrose observou-se, em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de transmissão, muitas áreas em que houve perda do contorno celular dos hepatócitos. Este tipo de lesão foi observado no fígado dos peixes *Heteropneustes fossilis* (DUTTA et al., 1993), *Brachydanio rerio* (RODRIGUES & FANTA, 1998) e *Onchorynchus mykiss* (UGUZ et al., 2003) expostos a diferentes poluentes. Observou-se em *R. quelen*, tanto perda do contorno celular dos hepatócitos quanto

das células endoteliais. O núcleo dos hepatócitos de *R. quelen* exposto ao Folidol[®] 600 apresentou características alteradas como a alta heterocromatização. Essa alteração foi observada e descrita por KÖHLER (1990) o qual pesquisou o grau de severidade de lesões hepáticas em *Platichthys flesus* devido a presença de diferentes contaminantes. Observações de TEH et al. (2005) e HUGH (1989) confirmam estes resultados. Os resultados do presente estudo sugerem que em *R. quelen* houve tanto uma redução da atividade metabólica quanto a ocorrência do processo de morte celular dos hepatócitos confirmado pela quantidade bastante reduzida de eucromatina no núcleo, em muitas regiões necrosadas.

Quando analisamos ultraestruturalmente os focos de necrose, observamos que a partir de 4 horas de exposição ao OP, nos hepatócitos, ocorrem alterações na organização do retículo endoplasmático rugoso (RER) e rompimento mitocondrial. O RER não estava situado paralelamente a membrana externa do envoltório nuclear, na forma de cisternas, como no controle, mas em forma de filamentos desorganizados dispersos pelo citoplasma. Possivelmente este fato esteja relacionado a uma desorganização do citoesqueleto interferindo nos processos de organização e localização espacial de organelas. Os resultados mostrando a desorganização e dispersão do RER podem interferir no metabolismo dos hepatócitos de *R. quelen* indicando a morte celular, uma vez que segundo HEATH (1995), estas células são normalmente ricas em RER e mitocôndrias, indicando uma alta atividade metabólica. Deve-se enfatizar, no entanto, que neste trabalho, nenhuma metodologia foi utilizada para verificar alterações no citoesqueleto do fígado de *R. quelen* quando submetida ao Folidol[®] 600.

A organização de organelas no citosol deve-se à presença do citoesqueleto que, por associação com proteínas motoras, posicionam estas organelas no interior do citosol (ALBERTS & ANDERSON, 2002). A desorganização do citoesqueleto pode afetar diretamente o tráfego de vesículas, a disposição e movimentação das organelas, trazendo como consequência danos na secreção e no metabolismo celular, e principalmente nos processos de detoxificação celular. Estudos ultraestruturais de PARIS-PALACIOS et al. (2000) relatam redução do RER e alterações mitocondriais em *Brachydanio rerio* exposto a concentrações subletais do sulfato de cobre.

Observou-se ultraestruturalmente no citoplasma dos hepatócitos de indivíduos de *R. quelen* exposto ao Folidol® 600 nas primeiras 48 horas uma alta incidência de gotículas lipídicas sendo marcante no tempo de 48 horas. Esta alta incidência não foi observada nos indivíduos controle. BIAGIANTI-RISBOURG & BASTIDE (1995) analisando ultraestruturalmente lesões hepáticas induzidas pelo herbicida Atrazine no peixe *Lisa ramada*, encontrou gotículas lipídicas que variavam em tamanho dependendo do tempo de exposição. Segundo ARELLANO et al. (1999), essa deposição lipídica pode indicar uma possível alteração no metabolismo lipídico dos hepatócitos. No presente estudo, não foi possível concluir nada, pois estas gotículas não foram mensuradas e quantificadas. Além disso, pelo fixador utilizado em microscopia de luz não foi possível a realização de técnicas de coloração específicas para lipídio para se afirmar com mais precisão a existência destas estruturas.

Observamos em *R. quelen* exposta ao Folidol® 600 o aparecimento de granulações grosseiras no citosol a partir de 24 horas. Estas são coradas fortemente com a eosina. Esta alteração foi confirmada pelas observações de RODRIGUES et al. (2001) em estudo com o OP Dipterex 500®. ANEES (1978) analisando o efeito de três tipos de OPs nos hepatócitos de *Channa punctatus* encontrou inclusões citoplasmáticas granulares quando exposto ao Diazinon, ao Metil paration e ao Dimetoato em 96 horas de exposição. Isto foi observado também em estudos do efeito do OP Dimetoato 500 nos hepatócitos de *Brachydanio rerio* em teste agudo de 96 horas por RODRIGUES & FANTA (1998).

HUGH (1989) descreve o aparecimento de granulações grosseiras como um aumento eosinofílico do citoplasma. Este fato originou em *R. quelen* uma tendência da diminuição da vacuolização citoplasmática, visto que, nos indivíduos controle, observa-se uma incidência marcante da vacuolização citoplasmática demonstrando que os hepatócitos dessa espécie em condições normais apresentam esta característica. Na literatura não existe uma explicação para o aparecimento dessas granulações grosseiras.

Ao analisarmos a congestão sanguínea em indivíduos de *R. quelen*, a partir de 48 horas experimental, observou-se que houve um pequeno aumento gradual na densidade de congestão sanguínea em relação ao controle, o que provavelmente poderia estar relacionado com a presença do Folidol® 600. Este aumento poderia

causar uma pequena anormalidade no sistema circulatório de *R. quelen* podendo levar o indivíduo a um início da diminuição das trocas metabólicas entre o sangue e os hepatócitos.

Para VERLAG (1982), a congestão sanguínea nos sinusóides ou em veias pequenas é uma mudança patológica que ocorre no fígado. Células hepáticas na área adjacente podem sofrer atrofia em casos severos de congestão. Segundo ROBERTS (1989) essa alteração é definida como o acúmulo de sangue causando dilatação dos vasos sanguíneos. Este distúrbio circulatório está relacionado com a diminuição da velocidade de circulação de sangue no local. Em grandes proporções causa diminuição das trocas metabólicas entre o plasma sanguíneo e o tecido, causando danos às células locais. GÜL et al. (2004), investigando a histopatologia hepática em peixe de água doce de áreas poluídas, observaram congestões sanguíneas, além de degenerações gordurosas micro e macro-vesiculares. Os autores associaram essas lesões com a ação tóxica de poluentes.

Pelo presente estudo pode-se perceber que o Folidol[®] 600 ocasionou várias alterações celulares no tecido hepático de *R. quelen*, comprometendo vias metabólicas e a sobrevivência da espécie. Estudar os efeitos de OPs em tecidos como o fígado através de testes de toxicidade aguda é importante, pois esses compostos não são persistentes no ambiente sendo considerados de vida curta.

Se os pesticidas forem selecionados, usados em combinação com outros métodos de controle de pragas, e aplicados com segurança, a poluição das nossas águas e a contaminação da vida aquática pode ser evitada, não só para proteger a produção animal e a Saúde Pública nesta área, mas também para proteger os animais e plantas em risco de extinção e seus habitats (AGUIAR et al., 2002).

6 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo pode-se concluir que:

- As doses de 0,04, 0,03 e 0,02 mL/L de Folidol[®] 600, administrada por via hídrica em *Rhamdia quelen*, causaram a morte dos animais após 24 horas de exposição.
- A dose de 0,01 mL/L de Folidol[®] 600, administrada por via hídrica em *R. quelen* foi subletal para o período do teste, 96 horas, havendo 100% de sobrevivência dos animais.
- O fígado de *R. quelen* é alvo de ação tóxica do Folidol[®] 600, e as alterações teciduais tornam-se evidentes a partir de 4 horas de exposição dos peixes à dose subletal.
- Perda do contorno celular, desorganização do retículo endoplasmático rugoso, rompimento mitocondrial, alta incidência de gotículas lipídicas no citosol e heterocromatização nuclear foram as alterações ultraestruturais observadas nos animais expostos ao Folidol[®] 600, após 4 horas de exposição.
- O Folidol[®] 600 não causou congestão sanguínea nem tão pouco alterações no número de melano-macrófagos no fígado de *R. quelen* exposto a 0,01 mL/L do contaminante.
- Houve um aumento significativo nos animais experimentais em relação ao controle quando analisamos a densidade de hepatócitos, a densidade de hepatócitos com pigmento biliar e focos de necrose.
- Mesmo em experimento agudo com dose subletal, o organofosforado Folidol[®] 600 causa visível prejuízo, podendo reduzir a eficiência funcional do fígado comprometendo a sobrevivência da espécie no seu ecossistema.

7 REFERÊNCIAS

AGIUS, C. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal Zoology**, London, v. 191, p. 11–31, 1980.

AGIUS, C. & ROBERTS, R. J. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. **Journal of Fish Biology**, v. 19, p. 161–169, 1981.

AGUIAR, D. C. R. de; HONRADO, H. R. R.; CORREIA, R. B. **Intoxicação em peixes por pesticidas utilizados na agricultura**. Disponível em: <<http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem0001/G24.HTM>> Acesso em: 24 jun. 2002.

AGUIAR, L. H. DE; MORAES, G; AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; CORRÊA, C. F. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research**, Orlando, v. 95, p. 224–230, 2004.

AGUIAR, L. H. DE; CORRÊA, C. F.; MORAES, G. Efeitos do pesticida organofosforado methyl parathion (Folidol 600[®]) sobre o metabolismo e atividade de colinesterases do teleósteo de água doce, *Brycon cephalus* (Matrinxã) (Günther, 1869). In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. R. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. **Ecotoxicologia: Perspectiva para o século XXI**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. p. 269–279.

ALBERTS, R. A. & ANDERSON, D. W. Mercury levels, reproduction and hematology in western grebs from three California lakes, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 17, p. 210–213, 2002.

ANAM, K. Comparative toxicity of a heavy metal and an organophosphate pesticide on gonads at spawning stage of an indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Ham.). **Marine Environmental Research**, Oxon, v. 46, n. 1-5, p. 173–177, 1998.

ANEES, M. A. Hepatic Pathology in a Fresh-water Teleost *Channa punctatus* (Bloch) exposed to sub-lethal and chronic levels of three organophosphorus insecticides. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 19, n. 5, p. 524-527, May. 1978.

ARANA, S. **Estrutura histológica do fígado de peixes**. Jaboticabal: Jaboticabal, 1995. **Semana sobre histologia de peixes**, p. 39-41. Resumo.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 44, p. 62-72, 1999.

ASSELBORN, V. M.; DOMITROVIC, Y. Z. DE; PARODI, E. Efectos del insecticida organofosforado clorpirifos sobre el crecimiento y morfología de *Selenastrum capricornutum* printz (Chlorophyta). In: ESPÍNDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. R. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. **Ecotoxicologia: Perspectiva para o século XXI**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. p. 281–289.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12714: Água – Ensaio de toxicidade aguda com peixes – Parte I – Sistema estático**. Rio de Janeiro, 1993.

BADAWY, M. I. Use and impact of pesticides in Egypt. **International Journal of Environmental Health Research**, Oxon, v. 8, p. 223-239, 1998.

BASTOS, V. L. F. C.; ROSSINI, A.; PINTO, L. F. R.; LIMA, L. M. de; Ceccarelli, P. S.; COELHO, M. G. P.; BASTOS, J. C. Different Sensitivities to Paraoxon of Brain and Serum Cholinesterases from Pacu, an Indigenous Brazilian Fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 60, p. 1-8, 1998.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish Diseases**, Oxford, v.22, p. 25–34, 1999.

BIAGIANTI-RISBOURG, S. & BASTIDE, J. Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): na ultrastructural study. **Aquatic Toxicology (Amsterdam)**, Amsterdam, v. 31, p. 217–229, 1995.

BRITO FILHO, D. **Toxicologia humana e geral**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988.

BULL, D. & HATHAWAY, D. **Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo**. Petrópolis: Vozes, 1986. 235p.

CABRINI, D. de A. **Determinação dos níveis tóxicos de organofosforados em ratos (*Rattus norvegicus*)**. Curitiba, 1992. 29 f. Monografia (Bacharelado em Biologia) – Setor de Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

CALDAS, L. Q. de A. **Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos biperidílicos e piretróides**. Disponível em: <<http://www.cepis.ops-oms.org/tutorial2/fulltex/intoxicacoes.pdf>> Acesso em 09 nov. 2003.

CARNEIRO, P. C. F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P. **Jundiá: Um grande peixe para a região Sul**. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/Paginas/revistas/69/jundia.asp>> Acesso em: 04 jun. 2002.

CAVERO, E. S.; GUERRA, M. S.; SILVEIRA, C. P. D. **Manual de inseticidas e acaricidas: aspectos toxicológicos**. Pelotas: Aimara Ltda., 1976.

CAVERO, E. S. **Inseticidas e acaricidas: toxicologia e receituário agrônomo**. 2. ed. Piracicaba: Livrocere, 1985.

CLARK, G. **Staining procedures**. 4. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1981.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **L5.019-I: Água – Teste de toxicidade aguda com peixes – Parte I – Sistema estático**. São Paulo, 1990.

CORRADINI, A. P. O ranking do veneno. **Saúde**, São Paulo, n. 237, p. 18–21, 2003.

CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. **Cellular pathology technique**. 4. ed. London: Butterworths, 1985.

DAS, P. & JONH, G. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. **Toxicology Letters (Amsterdam)**, Amsterdam, v. 104, p. 111-116, Sep. 1999.

DUTTA, H. M; ADHIKARI, S.; SINGH, N. K.; ROY, P. K.; MUNSHI, J. S. D. Histopathological Changes Induced by Malathion in the Liver of a Freshwater Catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 51, p 895-900, 1993.

ETO, M. **Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry.** Cleveland: CRC Press, 1974.

ETO, M. **Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry.** 3. ed. Cleveland: CRC Press, 1987.

FANTA, E. Organofosforados: bons para a agricultura, ruins para os peixes. Germinis: **Boletim do Conselho Federal de Biologia**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 3-4, 1997.

FANTA, E. Influence of the background color on the behaviour of the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia (Curitiba)**, Curitiba, v. 38, n. 4, p. 1237-1251, 1995.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; VIANNA, A. C. C.; ROMÃO, S.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water, and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 54, p. 119–130, 2003.

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental.** São Paulo: EPU – Editora Pedagógica e Universitária, 1980. 196p.

FERRANDO, M. D.; ANDREU, E.; ALMAR, M. M.; CEBRIAN, C.; ALARCÓN, V. Metabolic consequences of lindane exposure in the teleost fish, *Anguilla anguilla*. **Pfluegers Arch.**, v. 27, 1989.

FONSECA, M. F. Como agem os organofosforados no organismo humano e no de outros vertebrados. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 31, n.183, p. 8, 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. de A.; RAMOS, M. de L. L. de C. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos.** São Paulo: CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 1990.

GILL, T. S.; PANT, J. C.; PANT, J. Gill, Liver, and Kidney Lesions Associated with Experimental Exposures to Carbaryl and dimethoate in the Fish (*Puntius conchoni* Ham.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 41, p. 71-78, 1988.

GILL, T. S.; PANDE, J.; TEWARI, H. Sublethal Effects of an Organophosphorus insecticide on Certain Metabolite Levels in a Freshwater Fish, *Puntius conchoni* Hamilton. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Orlando, v. 36, p. 290-299, 1990.

GLAUBERT, A. M. **Practical methods in electron microscopy**. 4 ed. New York: Elsevier Biomedical Press, 1986. v. 5, part I, 311 p.

GOMES, L. de C.; GOLOMBIESKI, J., I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30A, p. 179–185, 2000.

GUIMARÃES, A. T. B. **Efeitos do uso de Trichlorfon em tratamentos contra parasitoses em piscicultura: análise das taxas de crescimento, avaliação histopatológica e sua ação sobre a atividade da colinesterase em *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Neopterygii)**. Curitiba, 2000. 51 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GÜL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, New York, v. 30, p. 605–609, 2004.

HAAPARANTA, A.; VALTONEN, E. T.; HOFFMANN, R.; HOLMES, J. Do macrophage centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality? **Aquatic Toxicology (Amsterdam)**, Amsterdam, v. 34, p. 253–272, 1996.

HARTLEY, W. P.; THYAGARAJAH, A.; TREINIES, A. M. Liver lesions in the gar fish (Lepisostidae) as biomarker of exposure. **Marine Environmental Research**, Oxon, v. 42, n. 1–4, p. 217–221, 1996.

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

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELAN, R. A.; OKIHIRO, M. S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of antropogenic stress.** Boca Roton: Lewis Publishers, 1992. p.155–208.

HOFFMAN, C. H. Are the insecticides required for insect control hazardous to aquatic life? Robert A. Taft Sanitary Engineering Center, U.S.P.H.S., Cincinnati, Ohio. **Technical Report W60**, v. 3, p. 51–61, 1960.

HUGH, W. F. **Systemic pathology of fish.** Ames: Iowa State University Press, 1989.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Manual de métodos para avaliação de toxicidade.** Curitiba, 1997.

JOKANOVIĆ, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, Shannon, v. 166, p. 139–160, 2001.

JONSSON, C. M. **Estudos de toxicidade e acúmulo de Endosulfan nos peixes *Brachydanio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*.** Campinas, 1991. 162 f. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

KÖHLER, A. Identification of contaminant-induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder (*Platichthys flesus* L.) caught at differently polluted estuaries. **Aquatic Toxicology (Amsterdam)**, Amsterdam, v. 16, p. 271–294, 1990.

KUMAR, K. & ANSARI, B. A. Malathion toxicity: effect on the liver of the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 12, p. 199–205, 1986.

LANGENBACH, T. Nova lógica no controle de agrotóxicos. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 152, p. 62-64, 1999.

LARA, W. A tolerância tem limites. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 22, p. 63, 1986.

LARINI, M. **Toxicologia.** São Paulo: Manole, 1987.

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

LU, F. C. **Basic toxicology**: fundamentals, target organs, and risk assessment. 3 ed. Washington: Taylor & Francis, 1996. 358 p.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, New York, v. 9, p. 409–414, 1961.

MACHADO, M. R. & FANTA, E. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology (Curitiba)**, Curitiba, v. 46, n. 3, p. 361–372, Jun 2003.

MACHADO, M. R. **Efeitos do organofosforado paration metílico na morfologia e ultraestrutura branquial do pacu *Metynnis roosevelti* EIGENMANN, 1915, e suas implicações ecotoxicológicas**. Curitiba, 1995. 74 f. Tese (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MALLATT, J. Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 42, p. 630–648, 1985.

MARICONI, F. **Toxicologia dos inseticidas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1958.

MARICONI, F. A. M.; ZAMITH, A. P. L.; ARAÚJO, R. L.; FILHO, A. M. O.; PINCHIN, R. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1985.

MAZON, A. F. & FERNANDES, M. N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 63, p. 797–804, 1999.

MELA, M. **Uso de biomarcadores na avaliação dos efeitos do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra)**. Curitiba, 2004. 129 f. Tese (Mestrado em Biologia Celular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MESEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M. A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell and Tissue Research**, v. 277, p. 1–10, 1994.

MIZUNO, S.; MISAKA, N.; MIYAKOSHI, Y.; TAKEUCHI, K.; KASAHARA, N. Effects of starvation on melano-macrophages in the kidney of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 209, p. 247–255, 2002.

MORAES, G. **Metabolic effects of the pesticide methyl parathion (Folidol 600®) on *Brycon cephalus* (matrinã), a teleost fish.** Disponível em: <<http://www.heb.pac.dfo.mpo.gc.ca/congress/2000/Papers/toxicologypdf/moraes.pdf>> Acesso em 09 out. 2003.

MOREIRA, L. A. **Efeitos comportamentais e histopatológicos do organofosforado Folidol 600 em *Oreochromis niloticus* L. (Cichlidae).** Curitiba, 1998. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

MURTY, A. S. **Toxicity of pesticides to fish.** Flórida: CRC Press, 1986.

NELSON, J. S. **Fishes of the world.** 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

NOREÑA-BARROSO, E.; SIMÁ-ÁLVAREZ, R.; GOLD-BOUCHOT, G.; ZAPATA-PÉREZ, O. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, Oxon, v. 48, p. 263–269, 2004.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** São Paulo: Atheneu, 1996.

PACHECO, M. & SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 53, p. 331–347, 2002.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology (Amsterdam)**, Amsterdam, v.50, p. 109–124, 2000.

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. **Marine Pollution Bulletin**, Oxon, v. 32, n. 2, p. 225–231, Feb. 1996.

PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental**: problemas e soluções. Rio de Janeiro, Fundação Getúlio Vargas, 1979.

PAWLOWSKY, U. **Tratabilidade de efluentes de fabricação de herbicidas**. Curitiba, 1994. 428 f. Tese (Concurso Público de Professor Titular de Controle de Poluição hídrica Industrial) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

PEREIRA, R. **Peixes de nossa terra**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1986.

PICKERING, A. D. **Stress and fish**. London: Academic Press, London, 1981.

RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F. M. ; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 60, n.2, p. 147–156, 2005.

RAMANESWARI, K. & RAO, L. M. Bioconcentration of Endosulfan and Monocrotophos by *Labeo rohita* and *Channa punctata*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 65, p. 618-622, 2000.

RAO, K. S. P. & RAO, K. V. R. Changes in the tissue lipid profiles of fish (*Oreochromis mossambicus*) during methyl parathion toxicity – a time course study. **Toxicology Letters (Amsterdam)**, Amsterdam, v. 21, p. 147–153, Dec. 1984.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208–212, 1963.

RICHMONDS, C. R. & DUTTA, H. M. Variations produced by Malathion on the serum protein fractions of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. **Comparative Pharmacology and Toxicology**, Oxford, v. 102C, n. 3, p. 403-406, 1992.

RIOS, F. S. **Metabolismo energético de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Erythrinidae) submetidos à privação de alimento e a realimentação.** São Carlos, 2001. 104 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

ROBERTS, R. J. **Patologia de los peces.** Madrid: MundiPrensa Libros, 1981. 372 p.

ROBERTS, R. J. **Fish pathology.** 2 ed. London: Braillière Tindall, 1989, 467 p.

RODRIGUES, E. de L. & FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* (HAMILTON-BUCHMAN, 1822, 1823) after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 15, n. 2, p. 441-450, 1998.

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

RODRÍGUEZ, M. **Bagre negro.** Disponível em: <<http://www.inape.gub.uy/Fichas%20de%20especies/Bagre%20negro.htm>> Acesso em: 18 jan. 2004.

ROEX, E. W. M.; KEIJZERS, R; GESTEL, C. A. M. van. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology (Amsterdam)**, Amsterdam, v. 64, p. 451–460, 2003.

SALGADO, P. E. de T.; FERNÍCOLA, N. A. G. G. de. **Noções gerais de Toxicologia Ocupacional.** São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1989, 144p.

SAMPAIO, D. P. de A. & GUERRA, M. de S. **Receituário Agrônomo.** Rio de Janeiro: Globo, 1988.

SAMUEL, M. & SASTRY, K. V. *In Vivo* Effect of Monocrotophos on the Carbohydrate Metabolism of the Freshwater Snake Head Fish, *Channa punctatus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 34, p. 1-8, 1989.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; FERNANDEZ, C.; ANDREU, E. Liver Energy Metabolism of *Anguilla anguilla* after Exposure to Fenitrothion. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 41, p. 168-175, 1998.

SANTHAKUMAR, M.; BALAJI, M.; RAMUDU, K. Effect of Sublethal Concentrations of Monocrotophos on Erythropoietic Activity and Certain Hematological Parameters of Fish *Anabas testudineus* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 63, p. 379-384, 1999.

SASTRY, K. V. & SHARMA, K. Diazinon-induced changes in *Ophiocephalus punctatus*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, Orlando, v. 5, p. 191–200, 1981.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO – SEAB. **Folidol 600**. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/agrotoxico>> Acesso em: 12 jul. 2002.

SILVA, H. C. **Efeitos subletais do Folidol 600 em *Callichthys callichthys* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Teleostei)**. Curitiba, 1989. 123 f. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Medicina Veterinária, UFPR.

SILVA, H. C.; MEDINA, H. S. G.; FANTA, E.; BACILA, M. Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (Methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei). **Comparative Pharmacology and Toxicology**, Oxford, v. 105C, n. 2, p.197-201, 1993.

SILVA FILHO, M. V. OLIVEIRA, M. M.; CUNHA, B. V. L. F.; ALVES, M. V.; CUNHA, B. J. (2000). Validação de espécies sentinelas para biomarcação com colinesterase de peixes. **Ecotoxicologia, perspectivas para o século XXI**. ESPÍNDOLA, E. L. G.; PASNCHOAL, C. M. R. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 575 p.

STURM, A.; DA SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**, Oxon, v. 47, p. 1–9, 1999.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological lectures**. 2. ed. Tokyo: Kodansha, 1995.

TEH, S. J.; DENG, D.; WERNER, I.; TEH, F.; HUNG, S. S. O. Sublethal toxicity of orchard stormwater runoff in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*) larvae. **Marine Environmental Research**, Oxon, v. 59, n. 3, p. 203–216, 2005.

THANGNIPON, W.; THANGNIPON, W.; LUANGPAÍBOON, P.; CHINABUT, S. Effects of the organophosphate insecticide, monocrotophos, on acetylcholinesterase activity in the Nile Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) brain. **Neurochemical Research**, New York, v. 20, n. 5, p. 587–591, 1995.

THIYAGARAJAH, A.; HARLEY, W. R.; ABDELGHANI, A. Hepatic hemosiderosis in buffalo fish (*Ictiobus* spp.). **Marine Environmental Research**, Oxon, v. 46, p. 203–207, 1998.

TSUDA, T.; AOKI, S.; KOJIMA, M.; HARADA, H. Bioconcentration and excretion of Diazinon, IBP, Malathion and Fenitrothion by Carp. **Comparative Physiology and Toxicology**, Oxford, v. 96C, n. 1, p. 23-26, 1990.

UGUZ, C.; ISCAN, M.; ERGÜVEN, A.; ISGOR, B.; TOGAN, I. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). **Environmental Research**, New York, v. 92, p. 262–270, 2003.

ULIANA, O.; DA SILVA, J. H., S.; RADÜNZ NETO, J. Diferentes fontes de lipídio testadas na criação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*), Pisces, Pimelodidae. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 129–133, 2001.

VARÓ, I.; SERRANO, R.; PITARCH, E.; AMAT, F.; LÓPEZ, F. J.; NAVARRO, J. C. Toxicity and Bioconcentration of Chlorpyrifos in Aquatic Organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 65, p. 623-630, 2000.

VERLAG, G. F. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Tokyo: Kodansha, 1982. 147 p.

WARE, G. W. **Fundamentals of Pesticides**. 3. ed. Fresno: Thomson, 1991. 307 p.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal Biophysical Biochemistry Cytology**, New York, v. 4, n. 4, p. 475–478, 1958.

WELSCH, U. **Sobotta, Histologia: atlas colorido de citologia, histologia e anatomia microscópica humana**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1999.

WESTER, P. W.; CANTON, J. H. The usefulness of histopatology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 100C, n. ½, p. 115–117, 1991.

WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates: a review. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 91–108, 1992.

YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Histologia funcional: texto e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. 415 p.

ZAMBRONE, F. A. D. Perigosa família. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 44–47, 1986.

8 ANEXOS

ANEXO I

FOLIDOL 600 é um inseticida e acaricida organofosforado que também possui ação de contato e ingestão.

INSTRUÇÕES DE USO:

CULTURAS	PRAGAS CONTROLADAS	DOSES EM		
		PROD. COM ml/ha	INGRED. ATIVO g/100l água	INGRED. ATIVO g/100l água
Algodão	Pulção do algodoeiro	500	-	300
	<i>Aphis gossypii</i>	500	-	300
	Curquerê	500-900	-	300-480
	Broca do algodoeiro	800-1000	-	480-600
	<i>Eutimothrus brasiliensis</i>	-	-	-
Alho	Bicudo	-	-	-
	<i>Anthonomus grandis</i>	-	-	-
Batata	Trips	100	-	60
	<i>Thrips tabaci</i>	-	-	-
	Pulgões	100	-	60
	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	-	-	-
	<i>Myzus persicae</i>	-	-	-
Cebola	Vaquinha verde amarela	-	-	-
	<i>Diabrotica speciosa</i>	-	-	-
Feijão	Trips	100	-	60
	<i>Thrips tabaci</i>	-	-	-
Milho	Trips	300	-	180
	<i>Caliothrips phaseoli</i>	-	-	-
Soja	Lagarta do cartucho	500	-	300
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	-	-	-
	Broca das axilas	800	-	480
	<i>Epinotia aporema</i>	333	-	200
	Lagarta da soja	800	-	480
Trigo	<i>Anticarsia gemmatilis</i>	800	-	480
	Percevejo verde	800	-	480
	<i>Nezara viridula</i>	-	-	-
	Percevejo marrom	-	-	-
	<i>Euschistus heros</i>	-	-	-
Trigo	Lagarta do trigo	500	-	300
	<i>Pseudaletia sequeax</i>	-	-	-
	Pulgões das folhas	500	-	300
	<i>Schizaphis graminum</i>	-	-	-
	<i>Rhopalosiphum padi</i>	-	-	-

MODO/EQUIPAMENTO DE APLICAÇÃO:

O produto deve ser aplicado com equipamentos terrestres, pulverizador costal manual, motorizado ou tratorizado). As gotas devem ter de 100 a 200 micras de diâmetro e densidade de 20 a 30 gotas/cm².

Quando se emprega pulverizadores de barra, recomenda-se usar bicos cônicos D₂ e D₃, pressão de 80 a 100 lb/pol² e 200 a 300 l de calda por hectare. Na cultura de batata deve ser usado 500 l de calda/ha.

NÚMERO, ÉPOCA E INTERVALO DE APLICAÇÃO:

Algodão: Iniciar a aplicação quando as pragas atingirem o nível de dano econômico, ou seja:

Pulgão: iniciar o controle quando, em 7 das 10 plantas examinadas as folhas estiverem começando a se deformar e existirem pulgões vivos. É importante o controle até 60 dias após o nascimento das plantas.

Bicudo: existem dois níveis de controle em relação ao estágio da cultura:

a - Dos 40 dias após a emergência do algodão até o surgimento da primeira flor: Quando encontrar 1 bolão perfurado em 20 examinados (5%).

b - Após o surgimento da primeira flor até os 110 dias após a emergência: Quando encontrar dois bolões perfurados em 20 examinados (10%).

Fazer a primeira aplicação aos 40 dias após emergência. Caso na amostragem dessa ocasião o nível de controle tenha sido atingido (5%), fazer uma bateria de pulverização, ou seja, três aplicações seguidas com intervalos de 5 dias.

Soja: Iniciar a aplicação quando forem encontradas 40 lagartas grandes por amostragem (2 m lineares da cultura) ou 4 percevejos grandes. Para produção de sementes, aplicar quando encontrar 2 percevejos grandes por amostra.

Trigo: Lagarta: iniciar o controle nos focos de infestação quando ainda existirem folhas verdes.

Pulgão: Da fase de emergência ao afilamento, controlar quando encontrar em média 10% de plantas com pulgões. Da fase de alongamento ao emborrachamento, quando a população média atingir 10 pulgões por filhio. Na fase reprodutiva quando a população média atingir 10 pulgões por espiga.

Para as demais culturas indicadas, recomendamos iniciar a aplicação logo após o aparecimento das pragas e repeti-las caso necessário.

INTERVALO DE SEGURANÇA: Proibidos os tratamentos nas culturas indicadas a partir de 15 dias que antecedem a colheita.

INTERVALO DE REENTRADA DE PESSOAS NAS CULTURAS E ÁREAS TRATADAS: Até 48 h após a aplicação, utilizar macacão de mangas compridas, chapéu impermeável de aba larga, luvas e botas para reentrar nas lavouras tratadas.

LIMITAÇÕES DE USO: Excluindo o intervalo de segurança e reentrada, não há outras limitações de uso.

INFORMAÇÕES SOBRE EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL A SEREM UTILIZADOS: Observar as recomendações quanto ao uso dos equipamentos indicados nas diferentes fases do item "PRECAUÇÕES DE USO E RECOMENDAÇÕES GERAIS".



Folidol®

600

Conteúdo:
1 litro

Tofosfato de dimetil paratrinofenilato (PARATION METÍLICO)60% m/v (600 g/l)
Inertes52% m/v (520 g/l)

**INSETICIDA E ACARICIDA DO GRUPO
DOS ORGANOFOSFORADOS
CONCENTRADO EMULSIONÁVEL**

Registrado no Ministério da Agricultura sob n° 00398401
Fabricante do Produto Técnico: Cheminova Agro A/S
Lemvig - Dinamarca

Registrante: **BAYER S.A.**

Proteção das Plantas

Rua Domingos Jorge, 1100

São Paulo/SP - CEP 04779-900 - fone: 0800-11-5560

CNPJ 14.372.981/0001-02

Registrada na Secretaria de Agricultura de São Paulo sob n° 003

Formulador: **BAYER S.A.**

Estrada da Boa Esperança, 650

Belford Roxo/RJ - CEP 26110-100

CNPJ 14.372.981/0014-27

LEIA O
RÓTULO E A
BULHA DE
UTILIZAÇÃO
E A CONSERVE EM SEU
PODER.

É
OBRIGATÓRIO O
USO DE EQUIPA-
MENTOS DE SEGU-
RANÇA. PROTEJA-SE

Número do Lote, Data de fabricação, Data de vencimento e conteúdo: vide rótulo.

CLASSE TOXICOLÓGICA II - ALTAMENTE TÓXICO
INFLAMÁVEL 1B



DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DA SAÚDE HUMANA:

MECANISMO DE AÇÃO, ABSORÇÃO E EXCREÇÃO PARA O SER HUMANO:

Não se dispõe de dados referentes ao ser humano. Em ratos após 48h, em média, 92,8 a 94,2% e 3,7 a 5,3% foram eliminados via urina e fezes respectivamente.

EFETOS AGUDOS E CRÔNICOS:

O produto formulado apresenta dose letal oral aguda (DL₅₀) para rato macho igual a 14 mg/kg. A DL₅₀ dérmica é de 161 mg/kg para rato macho. Sendo o mesmo enquadrado na Classe Toxicológica II. O nível sem efeito tóxico foi de 2 ppm no ensaio crônico com ratos.

EFETOS COLATERAIS/SINTOMAS DE ALARME:

Os sintomas de alarme são: Fraqueza, dor de cabeça, opressão no peito, visão turva, pupilas não reativas, salivação abundante, suores, náuseas, vômitos, diarreia e cólica abdominal.

PRECAUÇÕES DE USO E RECOMENDAÇÕES GERAIS, QUANTO A PRIMEIROS SOCORROS, ANTIDOTOS E TRATAMENTOS:

ANTES DE USAR LEIA COM ATENÇÃO AS INSTRUÇÕES

PRECAUÇÕES GERAIS:

- Não coma, não beba e não fume durante o manuseio do produto.
- Não utilize equipamentos com vazamentos.
- Não desentupa bicos, orifícios e válvulas com a boca.
- Não distribua o produto com as mãos desprotegidas.

PRECAUÇÕES NO MANUSEIO:

- Use protetor ocular.
- Se houver contato do produto com os olhos, lave-os imediatamente e VEJA PRIMEIROS SOCORROS.
- Caso o produto seja inalado ou aspirado, procure local arejado e VEJA PRIMEIROS SOCORROS.
- Use luvas de borracha.

• Ao contato do produto com a pele, lave-a imediatamente e VEJA PRIMEIROS SOCORROS.

- Use macacão com mangas compridas, chapéu de aba larga, óculos ou viseira facial, luvas, botas e avental impermeável.

PRECAUÇÕES DURANTE A APLICAÇÃO:

- Evite o máximo possível, o contato com a área de aplicação.
- Não aplique o produto contra o vento.
- O produto produz neblina, use protetor sobre nariz e boca.
- Use macacão com mangas compridas, chapéu impermeável de aba larga, luvas e botas.

PRECAUÇÕES APÓS A APLICAÇÃO:

- Não reutilize a embalagem vazada.
- Mantenha o restante do produto devidamente fechado em local trancado, longe do acesso de crianças e animais.
- Tome banho, troque e lave a roupa.
- No descarte de embalagens, lavagem de mangas compridas, luvas e botas.

PRIMEIROS SOCORROS:

Ingestão: Provoque vômitos logo o médico, levando a embalagem, rótulo, bula ou folheto agrônomo do produto.

Olhos: Lave com água em abundância e, se houver irritação, procure o médico levando a embalagem, rótulo, bula ou folheto agrônomo do produto.

Pele: Lave com água e sabão em abundância e, se houver irritação, procure o médico levando a embalagem, rótulo, bula ou folheto agrônomo do produto.

Inalação: Procure local arejado e vá ao médico levando a embalagem, rótulo, bula ou folheto agrônomo do produto.

TRATAMENTO MÉDICO DE EMERGÊNCIA/ANTIDOTO:

SULFATO DE ATROPINA E O SULFATO DE EMERGÊNCIA EM CASO DE INTOXICAÇÃO. NUNCA APLIQUE SULFATO DE ATROPINA ANTES DO APARECIMENTO DE SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO. Se o acidentado parar de respirar imediatamente respire ar artificial. Transporte-o rapidamente para assistência médica mais próxima.

Antídoto e tratamento (infusão para uso médico):

Sulfato de atropina, pelas vias subcutânea ou intravenosa (eventualmente também por via oral) a 2 mg cada 5 a 30 minutos, até atropinização leve.

Cximas (Contrainthion): 1 a 2 mg cada 5 a 30 minutos.

Contra-Indicações: morfina, tranquilizantes.

Telefones de emergência da empresa para informações médicas: Ligações gratuitas para São Paulo (0XX11) 5694-5333 - Rio de Janeiro (0XX21) 2761-4633

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO MEIO AMBIENTE:

PRECAUÇÕES DE USO E RECOMENDAÇÕES QUANTO AOS CUIDADOS DE PROTEÇÃO DO MEIO AMBIENTE:

- Este Produto é:
 - Altamente Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE I).
 - **MUITO PERIGOSO AO MEIO AMBIENTE (CLASSE II).**
 - Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE III).
 - Pouco Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE IV).
- Este produto é **ALTAMENTE PERIGOSO** para microcrustáceos.
- Este produto é **ALTAMENTE PERIGOSO** para aves.
- Este produto é **ALTAMENTE PERIGOSO** para abelhas, podendo afetar outros insetos benéficos.
- Este produto é **ALTAMENTE PERIGOSO** quando inalado por mamíferos.

- Evite contaminação ambiental - **Preserve a Natureza.**
- Não utilize equipamento com vazamento.
- Não aplique o produto na presença de ventos fortes ou nas horas mais quentes.
- Aplique somente as doses recomendadas.
- Não lave embalagens ou equipamento aplicador em lagos, fontes, rios e demais corpos d'água. Evite a contaminação da água.
- A destinação inadequada de embalagens ou restos de produtos ocasiona contaminação do solo, da água e do ar, prejudicando a fauna, a flora e a saúde das pessoas.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO DO PRODUTO, VISANDO SUA CONSERVAÇÃO E PREVENÇÃO CONTRA ACIDENTES:

- Mantenha o produto em sua embalagem original, sempre fechada.
- O local deve ser exclusivo para produtos tóxicos, devendo ser isolado de alimentos, bebidas, rações ou outros materiais.
- A construção deve ser de alvenaria ou de material não combustível.
- O local deve ser ventilado, coberto e ter piso impermeável.
- Coloque placa de advertência com os dizeres: **CUIDADO VENENOSO.**
- Tranque o local, evitando o acesso de pessoas não autorizadas, principalmente crianças.
- Deve haver sempre embalagens adequadas disponíveis para envolver embalagens rompidas ou para o recolhimento de produtos vazados.
- Em caso de armazéns, deverão ser seguidas as instruções constantes da NBR 9843 da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT.
- Observe as disposições constantes da legislação Estadual e Municipal.

INSTRUÇÕES EM CASO DE ACIDENTES:

- Isole e sinalize a área contaminada.
- Contate as autoridades locais competentes e a empresa **BAYER S.A.**, telefone **0800-243334**
- Utilize equipamentos de proteção individual - EPI (macacão de PVC, luvas e botas de borracha, óculos protetores e máscara contra eventuais vapores).
- Em caso de derrame, estanque o escoamento, não permitindo que o produto entre em bueiros, drenos ou corpos d'água. Siga as instruções abaixo:
- **Piso pavimentado:** absorva o produto com serragem ou areia, recolha o material com auxílio de uma pá e coloque em recipiente lacrado e identificado devidamente. O produto derramado não deverá mais ser utilizado. Neste caso, contate a empresa registrante, para que a mesma faça o recolhimento. Lave o local com grande quantidade de água.
- **Solo:** retire as camadas de terra contaminada até atingir o solo não contaminado, recolha esse material e coloque em um recipiente lacrado e devidamente identificado. Contate a empresa registrante conforme indicado acima.
- **Corpos d'água:** interrompa imediatamente a captação para o consumo humano ou animal, contate o órgão ambiental mais próximo e o centro de emergência da empresa, visto que as medidas a serem adotadas dependem das proporções do acidente, das características do corpo hídrico em questão e da quantidade do produto envolvido.

- Em caso de incêndio, use extintores de água em forma de neblina, CO₂ ou pó químico ficando a favor do vento para evitar intoxicação.

INFORMAÇÕES SOBRE DESTINO FINAL DE EMBALAGENS E SOBRES DE AGROTÓXICOS E AFINS:

PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM, ARMAZENAMENTO, DEVOLUÇÃO, TRANSPORTE E DESTINAÇÃO DE EMBALAGENS VAZIAS E RESTOS DE PRODUTOS IMPRÓPRIOS PARA UTILIZAÇÃO OU EM DESUSO:

• LAVAGEM DA EMBALAGEM:

Durante o procedimento de lavagem o operador deverá estar utilizando os mesmos EPI's - Equipamentos de Proteção Individual - recomendados para o preparo da calda do produto.

• Triplice Lavagem (Lavagem Manual):

Esta embalagem deverá ser submetida ao processo de Triplice Lavagem, imediatamente após o seu esvaziamento, adotando-se os seguintes procedimentos:

- Esvazie completamente o conteúdo da embalagem no tanque do pulverizador, mantendo-a na posição vertical durante 30 segundos;
- A dicione água limpa a embalagem até ¼ do seu volume;
- Tampe bem a embalagem e agite-a, por 30 segundos;
- Despeje a água de lavagem no tanque do pulverizador;
- Faça esta operação três vezes;
- Inutilize a embalagem plástica ou metálica perfurando o fundo.

• Lavagem sob Pressão:

Ao utilizar pulverizadores dotados de equipamentos de lavagem sob pressão seguir os seguintes procedimentos:

- Encaixe a embalagem vazia no local apropriado do funil instalado no pulverizador;
- Acione o mecanismo para liberar o jato de água;
- Direcione o jato de água para todas as paredes internas da embalagem, por 30 segundos;

- A água de lavagem deve ser transferida para o tanque do pulverizador;

- Inutilize a embalagem plástica ou metálica, perfurando o fundo. Ao utilizar equipamento independente para lavagem sob pressão adotar os seguintes procedimentos:

- Inicialmente após o esvaziamento do conteúdo original da embalagem, mantê-la invertida sobre a boca do tanque de pulverização, em posição vertical, durante 30 segundos;

- Manter a embalagem nessa posição, introduzir a ponta do equipamento de lavagem sob pressão, direcionando o jato de água para todas as paredes internas da embalagem, por 30 segundos;

- Toda a água de lavagem é dirigida diretamente para o tanque do pulverizador;

- Inutilize a embalagem plástica ou metálica, perfurando o fundo.

• ARMAZENAMENTO DA EMBALAGEM VAZIA:

Após a realização da Triplice Lavagem ou Lavagem Sob Pressão, esta embalagem deve ser armazenada com a tampa, em caixa coletiva, quando existente, separadamente das embalagens não lavadas.

O armazenamento das embalagens vazias, até sua devolução pelo usuário, deve ser efetuado em local coberto, ventilado, ao abrigo de chuva e com piso impermeável, ou no próprio local onde guardadas as embalagens cheias.

• DEVOLUÇÃO DA EMBALAGEM VAZIA:

No prazo de até um ano da data da compra, é obrigatória a devolução da embalagem vazia, com tampa, pelo usuário, ao estabelecimento onde foi adquirido o produto ou no local indicado na nota fiscal, emitida no ato da compra.

Caso o produto não tenha sido totalmente utilizado nesse prazo, a devolução deverá ocorrer até o fim do seu prazo de validade.

• TRANSPORTE:

As embalagens vazias não podem ser transportadas junto com alimentos, bebidas, medicamentos, rações, animais e pessoas.

• DESTINAÇÃO FINAL DAS EMBALAGENS VAZIAS:

A destinação final das embalagens vazias, após a devolução pelos usuários, somente poderá ser realizada pela Empresa Registrante ou por empresas legalmente autorizadas pelos órgãos competentes.

• É PROIBIDO AO USUÁRIO A REUTILIZAÇÃO E A RECI- LAGEM DESTA EMBALAGEM VAZIA OU O FRACIONAMENTO E REEMBALAGEM DESTA PRODUTO.

• EFEITOS SOBRE O MEIO AMBIENTE DECORRENTES DA DESTINAÇÃO INADEQUADA DA EMBALAGEM VAZIA E RESTOS DE PRODUTOS:

A destinação inadequada das embalagens vazias e restos de produtos no meio ambiente causa contaminação do solo, da água e do ar, prejudicando a fauna, a flora e a saúde das pessoas.

• PRODUTOS IMPRÓPRIOS PARA UTILIZAÇÃO OU EM DESUSO:

Caso este produto venha a se tornar impróprio para utilização ou em desuso, consulte o registrante através do telefone indicado no rótulo para sua devolução e destinação final.

Para desativação de restos de produto, contate a empresa BAYER S/A. e o Órgão Estadual de Meio Ambiente. A desativação do produto é feita através de incineração em fornos destinados para este tipo de operação e aprovados pelo Órgão Estadual responsável, equipados com câmaras de lavagem de gases efluentes.

TRANSPORTE:

O transporte é feito observando-se as normas da legislação vigente sobre cargas perigosas, que inclui o acompanhamento da ficha de emergência do produto, bem como determina que os agrotóxicos não podem ser transportados junto de pessoas, animais, alimentos, rações, medicamentos ou outros materiais.

TELEFONES DE EMERGÊNCIA:

BAYER S.A.
São Paulo - (0XX11) 5694-5333
Rio de Janeiro - (0XX21) 2761-4023

PRECAUÇÕES DE USO E ADVERTÊNCIAS QUANTO AOS CUIDADOS DE PROTEÇÃO AO MEIO AMBIENTE:

- Este produto é:
 - - Altamente Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE II);
 - - MUITO PERIGOSO AO MEIO AMBIENTE (CLASSE II);
 - - Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE III);
 - - Pouco Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE IV);
 - - Produto é ALTAMENTE TÓXICO para microcrustáceos.
 - Este produto é ALTAMENTE TÓXICO para aves.
 - Este produto é ALTAMENTE TÓXICO para abelhas, podendo afetar outros insetos.
- Este produto é ALTAMENTE TÓXICO quando inalado por mamíferos.
- Evite contaminação ambiental - Preserve a Natureza.
- Não utilize equipamento com vazamento.
- Não aplique o produto na presença de ventos fortes ou nas horas mais quentes.
- Não lave embalagem ou equipamento aplicador em lagoas, fontes, rios e demais corpos d'água. Evite a contaminação da água.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO DO PRODUTO, VISANDO SUA CONSERVAÇÃO E PREVENÇÃO CONTRA ACIDENTES:

- Manter o produto em sua embalagem original, sempre fechada.
- O local deve ser exclusivo para produtos tóxicos, devendo ser isolado de alimentos, bebidas, rações ou outros materiais.
- A embalagem deve ser armazenada com rótulo ou de material não combustível.
- O local não deve ser ventilado, coberto e ter piso impermeável.
- Coloque placa de advertência com os dizeres: **CUIDADO VENENOSO.**
- Tranche o local, evitando o acesso de pessoas não autorizadas, principalmente crianças.
- Deve haver sempre recipientes disponíveis para envolver embalagens comprometidas.
- Observar as instruções de segurança contidas nas instruções da NBR 9040 da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT.
- Observe legislação Estadual e Municipal.

EM CASO DE ACIDENTE:

- Não ingerir o produto.
- Utilize equipamentos de proteção individual.
- Contate as autoridades locais competentes e a empresa BAYER S.A., telefone 0800-243334.
- Procure impedir que o produto atinja bueiros, drenos ou corpos d'água.
- Evite contato com a pele, com os olhos e com a boca.
- Procure ficar a favor do vento para evitar inalação.

DEVOLUÇÃO DE EMBALAGENS VAZIAS:

• O destino a ser adotado para as embalagens devolvidas ao estabelecimento onde foi adquirido o produto deve ser indicado por escrito, na nota fiscal de compra, conforme instruções da bula. Não armazene ou transporte embalagens vazias junto com alimentos, bebidas, rações, medicamentos, animais ou pessoas.

- A destinação inadequada de embalagens e restos de produtos no meio ambiente causa contaminação do solo, da água e do ar, prejudicando a fauna, a flora e a saúde das pessoas.
- SIGA AS INSTRUÇÕES CONTIDAS NA BULA REFERENTES AOS PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM E/OU DESTINAÇÃO DE EMBALAGENS.

PRODUTOS IMPRÓPRIOS PARA UTILIZAÇÃO OU EM DESUSO:

Caso este produto venha a se tornar impróprio para utilização ou em desuso, consulte o registrante responsável pelo recolhimento e destinação final de restos de produtos.

TRANSPORTE DE AGROTÓXICOS, COMPONENTES E AFINS:

• Este é sujeito às regras e aos procedimentos estabelecidos na legislação específica.



ANEXO II**QUANTIDADE DE PARATION METÍLICO CONTIDA NAS DOSES DE FOLIDOL[®] 600 ADMINISTRADA EM *Rhamdia quelen* POR VIA HÍDRICA**

TABELA 2 - Relação dose/animal de Paration metílico, princípio ativo do Folidol[®] 600 administrado.

Folidol[®] 600 (mL/L)	Quantidade de Paration metílico administrada (mg/L) *
0,04	24
0,03	18
0,02	12
0,01	6

* Calculada a partir da concentração do Paration metílico (600 g/L) no produto comercial Folidol[®] 600.

ANEXO III**PREPARO DE SOLUÇÕES****ALFAC**

Reagentes para 100 mL de solução

Álcool a 80% 85 mL

Formaldeído 10 mL

Ácido Acético Glacial 5 mL

Preparo: Misturar e obter solução homogênea na hora do uso.

ALBUMINA DE MAYER

Reagentes para 50 mL de solução

Glicerina uma parte

Clara de ovo uma parte

Cristais de Timol

Preparo: Agitar a glicerina com a clara de ovo por 30 minutos. Filtrar e acrescentar alguns cristais de timol para evitar fungos. Conservar sob refrigeração.

KARNOVSKY (Modificado)

Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2% em Tampão Cacodilato 0,2M pH 7,2

Paraformaldeído 4%

Paraformaldeído 1g

Água destilada 25 mL

Preparo: Agitar sob aquecimento, quando atingir 60°C adicionar NaOH 0,2M até a solução clarear (3 a 4 gotas). Pode ser deixado em estoque na geladeira.

Glutaraldeído 10%

Glutaraldeído 25 mL

Água destilada 10 mL

Esta solução pode ser mantida em estoque na geladeira.

Tampão cacodilato 0,8M

Cacodilato 1,6g

Água destilada 12,85 mL

Preparo: Adicionar o cacodilato a 10 mL de água destilada e acertar o pH 7,2 (NaOH) 0,1N ou HClO,1N. Completar o volume para 12,85 mL. Acertar o pH 7,2 do tampão cacodilato antes de adicionar o glutaraldeído e o paraformaldeído. Esta solução pode ser mantida na geladeira (antes da mistura).

Preparo do Karnovsky

- Em um Becker adicionar glutaraldeído 10% e cacodilato 0,8M (1:1) (solução final: glutaraldeído 5% em tampão cacodilato 0,4M).
- Em um Becker adicionar paraformaldeído e glutaraldeído (solução final: glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,2M)

Reagentes para 50 mL de Karnovsky

Paraformaldeído 2%	25 mL
Glutaraldeído 10%	12,5 mL
Tampão cacodilato 0,8M pH 7,2	12,5 mL

TAMPÃO CACODILATO 0,2M

Peso molecular 214

Cacodilato	2,14g
Água destilada	50 mL

TAMPÃO CACODILATO 0,4M

Peso molecular 214

PM 2,14 g ----- 50 mL ----- 0,2 M

x g ----- 50 mL ----- 0,4 M

$$x g = 4,28 g$$

Cacodilato	4,28 g
Água destilada	50 mL

TETRÓXIDO DE ÓSMIO A 2%

OsO₄ a 4%

Preparo: Quebra-se uma ampola de OsO₄ de 1g em 25 mL de água destilada.

OsO₄ a 2%

Preparo: Dilui-se o OsO₄ a 4% em tampão cacodilato 0,4M na mesma proporção (1:1).

RESINA EPON

Reagentes para 100 mL de solução

Solução A

EMBED 812 15,3 mL

DDSA 24,7 mL

Preparo: Agitar por 30 minutos no Stirrer. Lacrar o vidro com parafilm e conservar na geladeira.

Solução B

EMBED 812 31,74 mL

NMA 24,7 mL

Preparo: Agitar por 30 minutos no Stirrer. Lacrar o vidro com parafilm e conservar na geladeira.

Solução útil

Solução A 10 mL

Solução B 15 mL

DMP – 30 0,25 mL (ou 10 a 15 gotas)

Preparo: Conservar o DMP – 30 em geladeira, porém utilizá-lo em temperatura ambiente. Deve-se tirar a Epon pura da geladeira 1 1/2 a 3 horas antes do uso e antes da utilização agitar (manualmente) por 10 minutos.

URANILA AQUOSA 2%

Uranila 2 g

Água destilada 100 mL

Preparo: Num bécker diluir a uranila na água destilada e levar ao agitador magnético por cerca de 1 hora. Revestir o bécker com papel alumínio para proteger da luz (devido a uranila reagir com a luz).

SOLUÇÃO DE REYNOLDS

Nitrato de chumbo 1,30 g

Citrato de sódio 1,75 g

Hidróxido de sódio 1N 8 mL

Água destilada 50 mL

Preparo: Aquecer a água destilada e deixar esfriar em banho Maria. Dissolver o nitrato de chumbo e o citrato de sódio em uma quantidade de água destilada. Agitar e deixar em repouso intercaladamente durante trinta minutos. Adicionar gota a gota a solução de hidróxido de sódio 1N até a solução ficar transparente. Adicionar à solução a quantidade de água destilada para completar o volume total da solução.

HEMATOXILINA DE HARRIS

Reagentes para 200 mL de solução

Alúmen de Potássio.....	20 g
Óxido de Mercúrio amarelo.....	0,5 g
Hematoxilina.....	1,0 g
Álcool a 95% P.A.....	10,0 mL
Água destilada.....	200 mL
*Ácido Acético Glacial.....	5 mL

*Para ser adicionado a cada 95 mL de solução na hora do uso.

Preparo: Aquecer a água destilada, retirar do fogo e misturar o alúmen de potássio (no agitador magnético). Deixar de um dia para o outro. Dissolver a hematoxilina no álcool. Misturar as duas soluções. Adicionar o óxido de mercúrio. Deixar ferver por 5 minutos (a partir do momento em que começou a borbulhar). Dar um choque térmico colocando para esfriar em água corrente. Filtrar. Adicionar o Ácido Acético Glacial na hora do uso.

EOSINA 1% (Solução estoque)

Reagentes para 100 mL de solução

Eosina 1%	1 g
Água destilada.....	20 mL
Álcool 95% P.A.....	80 mL

Procedimento: Misturar os reagentes e obter uma solução homogênea.

EOSINA ÚTIL

Reagentes para 100 mL de solução

Eosina 1%	25 mL
Álcool 80% P.A.	75 mL
*Ácido Acético Glacial.....	0,5 mL

* Para ser adicionado a cada 100 mL de solução corante apenas na hora do uso.

ANEXO IV

Processamento para Microscopia de Luz (CULLING et al., 1985).

a. Fixação em Fluido de Alfac..... 16 horas

b. Duas lavagens sucessivas em álcool a 70%

c. Desidratação:

→ Álcool a 80%.....30 min

→ Álcool a 90%.....20 min

→ Álcool a 95%.....20 min

→ Álcool a 95%.....20 min

→ Álcool a 100% (1º banho)20 min

→ Álcool a 100% (2º banho)20 min

→ Álcool a 100% (3º banho)20 min

d. Diafanização

Xilol I..... 15 min

Xilol II..... 15 min

e. Impregnação na estufa a 58° C com:

Paraplast Plus (1º banho)..... 1 hora

Paraplast Plus (2º banho)..... 30 min

f. Emblocagem:

Emblocagem em moldes cúbicos de papel com Paraplast Plus[®] solidificado a temperatura ambiente.

g. Microtomia:

Trimagem dos blocos em forma de pirâmide para serem seccionados em 3 micrômetros em Micrótopo Leica RM 2145.

h. Lâminas:

Montagem de lâminas, com os cortes obtidos na microtomia, através da aderência com Albumina de Mayer, sendo os cortes esticados em placa aquecedora e secos em temperatura ambiente antes de serem corados.

i. Coloração

Técnica de rotina para Hematoxilina/Eosina

ANEXO V**Protocolo para Coloração dos Cortes de Tecidos (CLARK, 1981).**

Xilol I	3 min
Xilol II	3 min
Álcool a 90%	3 min
Álcool a 70%	3 min
Lavar com água filtrada e em seguida com água destilada.	
Corar com Hematoxilina de Harris	20 min
Lavar com água filtrada e em seguida com água destilada.	
Corar com Eosina Útil	3 min
Lavar com água filtrada e em seguida lavar com água destilada.	
Álcool a 100% I	3 min
Álcool a 100% II	3 min
Álcool a 100% P.A. + Xilol (1:1)	3 min
Xilol (diafanizador).....	3 min
Xilol (montagem)	3 min
Montar lâmina com resina Permout.	

ANEXO VI

Processamento Ultraestrutural - Microscopia Eletrônica de Transmissão (CULLING et al., 1985; GLAUBERT, 1986 modificado; LUFT, 1961; REYNOLDS, 1963; WATSON, 1958).

- a. Fixar em Karnovsky por 4 horas a temperatura de 4° C.
- b. Armazenar em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 a 4° C.
- c. Pós-fixação com Tetróxido de Ósmio 2% em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 por 1 hora a 4° C.
- d. Lavar com tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2, 1 vez a 4° C.
- e. Lavar em água destilada por duas vezes.
- f. Contrastação em bloco: com Acetato de Uranila aquosa 2% durante 2 horas.
- g. Lavar com água destilada por duas vezes.
- h. Desidratação: Álcool 50% - duas vezes de 5 minutos;
Álcool 70% - duas vezes de 5 minutos;
Álcool 95% - duas vezes de 10 minutos;
Álcool 100% - três vezes de 10 minutos;
Álcool 100% + acetona (1:1)- uma vez de 10 minutos.
- i. Acetona P.A. - duas vezes de 15 minutos.
- j. Pré-infiltração: Acetona + resina (1:1) – durante 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente; Resina pura – overnight (obrigatoriamente).
- l. Dia seguinte: incluir em resina Epon e polimerizar na estufa a 60° C durante 72 horas.
- m. Cortar em Ultramicrótomo.
- j. Coletar os cortes ultrafinos em tela de cobre.