

ELZIRA MARIA BAGATIN MUNHOZ

**COMPROMETIMENTO MORFOLÓGICO E METABÓLICO
DO TECIDO HEPÁTICO DE *Prochilodus scropha*
(PISCES, PROCHILODONTIDAE) EXPOSTO
SUBLETALMENTE AO BI-HEDONAL**

Tese apresentada à Universidade Federal
do Paraná para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias.

GURITIBA

1993

Alles ist aus dem Wasser entsprungen
Alles wird durch das Wasser erhalten

Tudo surgiu da água
Tudo é mantido pela água

(Goethe)

À memória de meus pais
e ao Carlos, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao ilustre orientador, Prof. Dr. Metry Bacila, Coordenador do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, pela dedicação e pelos seguros e inestimáveis ensinamentos que me proporcionou durante todas as etapas do curso de Pós-graduação.

À Co-orientadora Profa. Dra. Edith Fanta, Coordenadora do Curso de Pós-graduação do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, pela dedicação e pelos importantes esclarecimentos prestados nas diferentes etapas de execução dos bioensaios e das avaliações morfológicas.

À Farmacêutica Bioquímica Marvina Natsue Imoto pela colaboração e importante auxílio prestado durante a avaliação bioquímica realizada.

Ao Prof. Dr. Heitor Segundo G. Medina e à Eng. Química Charlotta Wahrhaftig pelo auxílio técnico prestado durante a execução das pesquisas desenvolvidas no presente ensaio.

À Sra. Tânia Mara Schrank, Secretária do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná pela dedicação que sempre colocou em todas as etapas de nossas atividades.

À Companhia Paranaense de Energia Elétrica, COPEL, pelo fornecimento dos animais utilizados no presente estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado e pelo auxílio financeiro concedido para a execução das pesquisas realizadas.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. HISTÓRICO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
2.1.1 Biologia do Prochilodus scropha	25
2.1.2 Coleta, Transporte e Manejo.....	26
2.2 BIOENSAIOS.....	27
2.3 METODOLOGIA.....	28
2.3.1 Concentração Letal Média.....	28
2.3.2 Exposição do Bi-Hedonal.....	30
2.3.3 Experimentação Bioquímica.....	31
2.3.4 Análise Morfológica.....	34
2.3.4.1 Coleta do Material para Análises Histológicas.....	34
2.3.4.2 Metodologia Histológica.....	35
3. RESULTADOS.....	36
3.1 Determinação da Diluição Subletal do Bi-Hedonal para o P. scropha	36
3.2 Comprometimento respiratório dos hepatócitos de P.scropha expostos ao Bi-Hedonal.....	38

3.3 Efeitos do Bi-Hedonal sobre a morfologia do tecido hepático de P.scropha	40
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

2.1 Preparação da fração mitocondrial a ser testada em Respirômetro de Warburg.....	33
3.1 Concentração Letal Média do Bi-Hedonal para o P.scropha	37
3.2 Inibição metabólica de mitocôndrias hepáticas de P.scropha expostos sub-letalmente ao Bi-Hedonal.....	39

LISTA DE TABELAS

1.1 Classificação Toxicológica dos Pesticidas, segundo a Organização Mundial de Saúde.....	14
1.2 Compostos fenoxiacéticos comercializados atualmente.....	19
2.1 Diluições do herbicida Bi-Hedonal utilizado na determinação da LC ₅₀ para o P. scropha	29
3.1 Quociente Respiratório de Mitocôndrias hepáticas de P.scropha expostos sub-letalmente ao Bi-Hedonal.....	38
3.2 Alterações morfológicas do tecido hepático de P.scropha exposto sub-letalmente ao Bi-Hedonal.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

DDT:- 2,2 bis(p-clorofenil)etano-1,1,1 tricloro.

MCPA:- ácido 2-cloro, 4-metil fenoxiacético.

MCPB:- ácido 2-cloro, 4-metil fenoxipropiônico.

2,4-D:- ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

2,4,5-T:- ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético.

COPEL:- Companhia Paranaense de Energia Elétrica.

SUREHMA:- Superintendência de Recursos Hídricos e Meio Ambiente.

OMS:- Organização Mundial da Saúde.

OPS:- Organização Panamericana da Saúde.

RESUMO

Para estabelecer os efeitos subletais do herbicida hormonal fenoxiacético BI-HEDONAL (BAYER DO BRASIL) cujos princípios ativos são o 2,4-D (ácido 2,4-diclofenoxiacético) e o MCPA (ácido 2-metil, 4-clorofenoxiacético), foi utilizado, como animal experimental o **Prochilodus scropha** (Curimba, Curimatá), um peixe cipriniforme da família Prochilodontidae; cujo habitat principal é a bacia do Rio Paraná, nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná.

Foram estabelecidos inicialmente os níveis subletais do Bi-Hedonal, determinados a partir da exposição dos animais à diluições de 0,03; 0,05; 0,07; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 ml/l da formulação comercial do herbicida, diretamente na água dos recipientes-teste.

Foi verificado que as diluições abaixo de 0,07 ml/l do herbicida mostraram-se não letais ao **P.scropha**, enquanto que as diluições acima de 0,3 ml/l do herbicida mostraram-se letais à espécie. A diluição de 0,1 ml/l do herbicida mostrou ser o TLM do composto para a espécie, sob as condições laboratoriais mantidas.

Foi avaliado o comprometimento mitocondrial do tecido hepático dos animais expostos por 24 horas à diluição de 0,05 ml/l do herbicida, a até 120 horas após o início da exposição, através da determinação do Quociente Respiratório para o Oxigênio, pela Técnica Gasométrica de Warburg. O QO_2 obtido para os animais expostos apontou inibições em torno de 90% da capacidade respiratória mitocondrial do tecido hepático a até 72 horas após o início da experimentação, quando passou a apresentar uma nítida recuperação.

Foram estudadas as alterações morfológicas provocadas no tecido hepático pela exposição dos animais à diluição de 0,05 ml/l do herbicida por 24 horas, e dos animais do grupo controle; sacrificados após 2, 4, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o início da exposição. São as seguintes as lesões histológicas encontradas no tecido hepático dos animais expostos ao herbicida: hipertrofia, congestão circulatória, vacuolização e lateralização nuclear, condensação de nucléolos, além da presença de depósitos intracelulares e de grãos castanhos.

ABSTRACT

Studies on the sublethal effects of the technical herbicide Bi-Hedonal (2,4-D or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine acetate + MCPA or 2-methyl, 4-chlorophenoxyacetic acid dimethylamine acetate) on the tropical fish *Prochilodus scropha* (PISCES, PROCHILODONTIDAE) were carried out. Those effects were established in fish maintained in captivity under laboratorial conditions. The fishes were exposed to the herbicide at different dilutions of the commercial product. It has been found that concentrations below 0,07 mL/L of the herbicide are not lethal to *P.scropha*. On the other hand, concentrations of the herbicide from 0,3 mL/L up are lethal to the fish. The concentration of 0,1 mL/L of the herbicide showed to be a TLm for *P.scropha* under laboratorial conditions. At the bioassay the fish were maintained for 24 hours in containers-test with 0,05 mL/L of the herbicide, and removed to containers free of the herbicide. Measurements at respiratory capacity of the isolated liver mitochondria were carried out at 2, 4, 24, 48, 72, 96 and 120 hours after the beginning. It has been found that the Bi-Hedonal is capable to affect the liver of the alive fishes exposed to it.

Furthermore, it has been found also, that after 72 hours of the beginning exposition, the livers showed a recovery of the metabolic properties analysed in terms of the isolated mitochondria respiration. Control studies of the possible effects of the Bi-Hedonal on the livers cell structures were also carried out in samples obtained from the same experimental animals. The main morphological changes verified were hypertrophy of the hepatocytes, nuclear displacement, cytoplasmic vacuolization and storage of brown grains.

1 HISTÓRICO

O emprego de pesticidas em atividades agrícolas já era comentado por Plínio, no ano de 70 D.C., e integrava o conhecimento dos chineses desde o século XVI. Não obstante, estas substâncias tiveram um uso bastante limitado, até a descoberta do DDT e outros inseticidas hidrocarbonicos clorados.

Entre os anos de 1950 e 1960, detectou-se a presença de grandes concentrações destes inseticidas no solo, e em menores quantidades na água e sedimentos de rios e lagos.

Foi somente a partir da observação da morte de pássaros, animais silvestres e peixes depois de operações de pulverização em culturas agrícolas e bosques, que surgiu o interesse a respeito dos riscos causados pela aplicação usual daqueles compostos ao meio ambiente

Atualmente, são considerados como pesticidas, um grande número de substâncias químicas com características muito diferentes, avaliados segundo sua aplicabilidade, considerando-se o organismo sobre o qual atuam; como os inseticidas, os acaricidas, os raticidas, os fungicidas e os herbicidas; ou agrupados segundo sua natureza fisico-química, e divididos em tres categorias, a dos pesticidas inorgânicos, dos orgânico-sintéticos e os de origem vegetal.

Os pesticidas inorgânicos são aqueles à base de arsênico; enquanto que os de origem vegetal são extraídos de diferentes espécies vegetais, como a nicotina e os piretróides.

Os compostos organo-sintéticos são os mais bio-resistentes, fabricados industrialmente em larga escala e a preços relativamente baixos, o que facilita e amplia sua aquisição e aplicabilidade. Entre eles estão os inseticidas hidrocarbonicos clorados, como o Hexaclorociclohexano, o Lindano, o Clordano, o Aldrin, o Endrin, o Dieldrin e o DDT; os compostos organo-fosforados e carbamatos, como o Malation, Paration e Metil-Paration; os herbicidas clorofenoxiacéticos derivados dos ácidos 2,4-D; 2,4,5-T e MCPA.

Além da tradicional classificação em dois grupos, em 1978, a Organização Mundial da Saúde desenvolveu uma classificação dos pesticidas segundo o grau de periculosidade daqueles compostos ao homem, referindo-se às doses letais médias de cada pesticida.

Esta classificação considera quatro categorias, segundo a toxicidade do composto, expressa em DL50 ou Dose Letal Média para ratos, em miligramas de substância por peso do animal, em que 50% dos animais expostos morrem. Observe-se que a dose letal média varia conforme a forma de apresentação do

composto e segundo as vias de administração usados, bem como com o organismo considerado (TABELA 1.1).

Até a década passada, já foram detectados pelo menos 100.000 contaminantes ambientais, naturais ou produtos diversos da atividade humana, nos mais diversos ecossistemas.

VEGA (1985) define tóxico ambiental como sendo qualquer substância potencialmente nociva que se encontre disseminada num ecossistema.

O risco associado ao uso e contaminação ambiental por substâncias potencialmente tóxicas, é avaliado com base no impacto biológico da substância e dos volumes de emissão e dispersão do contaminante.

Já o impacto biológico de um contaminante ambiental é avaliado em função de sua toxicidade e da natureza e importância ecológica dos eventuais receptores biológicos presentes no ecossistema atingido.

Segundo estatísticas citadas por VEGA (1985), apenas 19% da produção norte americana anual de pesticidas atinge o organismo alvo objetivo de sua aplicação; enquanto que os 90% restantes simplesmente dispersam-se pelo meio ambiente, onde podem facilmente alcançar os cursos e mananciais de água, por uma infinidade de caminhos.

O principal mecanismo de contaminação da água pelos pesticidas é o escoamento de terrenos agrícolas e por despejos industriais das fábricas que os produzem.

Os compostos organoclorados geralmente mantêm-se em suspensão na água, devido à sua baixa solubilidade neste veículo; e o principal fator de remoção destes compostos dos rios parece ser a sedimentação.

Dentre os fatores que determinam a cinética ambiental dos pesticidas incorporados ao ambiente aquático, são de especial influência a volatilidade, degradabilidade e solubilidade em água do composto; bem como seu grau de ionização e dissociação.

BRANCO (1972) registra evidências de que o DDT e o BHC diminuem nos sedimentos de fundo sob condições anaeróbicas, o que levanta a hipótese de esta ser uma via ativa e eficiente na retirada destes compostos dos cursos de água; enquanto CHEN (1989) sugere degradação bacteriana do 2,4-D em ambientes lacustres de clima temperado.

TABELA 1.1 Classificação Toxicológica dos Pesticidas , segundo a Organização Mundial de Saúde, Modificado a partir de World Health Organization , The Who Recommended Classification of Pesticides by Hazard, 1984 - 1985. WHO: Geneve, 1984 (ver VEGA, 1985).

CLASSE I.A: EXTREMAMENTE PERIGOSOS

- DL 50: maior que 40 mg/kg
- Identificados comercialmente pela tarja vermelha
- Exemplos: DIELDRIN
LEPTOFÓS
PARATION

CLASSE I.B: ALTAMENTE PERIGOSOS

- DL 50: entre 5 e 400 mg/kg
- Identificados comercialmente pela tarja amarela
- Exemplos: ALDRIN
DICLORVÓS
FENTION

CLASSE II: MODERADAMENTE PERIGOSOS

- DL 50: entre 50 e 2.000 mg/kg
- Identificados comercialmente pela tarja azul
- Exemplos: CLORDANO
DDT

CLASSE III: DISCRETAMENTE PERIGOSOS

- DL 50: de 500 a mais de 4.000 mg/kg
 - Identificados comercialmente pela tarja verde
 - Exemplos: MALATION
-

Os herbicidas clorofenoxiacéticos são substâncias bem menos resistentes no ambiente do que os inseticidas organoclorados, e, de acordo com BRANCO (1972), geralmente apresentam baixa toxicidade para mamíferos.

Os herbicidas são bem mais solúveis em água que os inseticidas, propriedade que os capacita a infiltrarem-se muito mais facilmente no solo.

Em relação à persistência na água, os herbicidas geralmente não permanecem neste ambiente por muito tempo, de modo que eventuais riscos provocados por sua presença nos ecossistemas aquáticos adquire um caráter de instantaneidade, além disto, a maioria deles é menos tóxico aos peixes do que os inseticidas organoclorados.

A presença de resíduos de agrotóxicos nos rios paranaenses é uma realidade já a muitos anos, conforme demonstrado pela Superintendência de Recursos Hídricos e Meio Ambiente - SUREHMA, em relatório técnico publicado no ano de 1984.

O relatório apresenta um levantamento das amostras de água analisadas pela instituição entre os anos de 1976 e 1984, abrangendo 12 das 16 bacias hidrográficas do Paraná - Iguaçu, Tibagi, Ivaí, Cinzas, Paranapanema, Itararé, Pirapó, Paraná I e II, Ribeira, Litorânea e Piquiri.

MEDEIROS et al (1984) demonstraram que 91,4% das análises realizadas em amostras de água "in natura" de mananciais de abastecimento apresentavam resíduos de pelo menos um agrotóxico. Este percentual caiu para 87,5% para mananciais não utilizados para abastecimento, e 70% para a água tratada.

Quando lançados ao ambiente, e, em particular aos corpos de água, os pesticidas químicos são passíveis de serem degradados por microorganismos, quando possuem constituição química próxima a de certos compostos naturais. Assim, estão sujeitos à hidrólise microbiana os fenilcarbamatos, os acilalínidos e as feniluréias (VILLELA, 1977).

O ataque enzimático microbiano entretanto, não é suficiente para a decomposição de produtos químicos que contenham halogênios - cloro em especial, ligados ao anel benzênico da molécula. Vale ressaltar que este, quando sozinho, normalmente é degradado a níveis ambientalmente satisfatórios.

MEARNS et al (1971), analisando as possíveis correlações entre o descarte doméstico em cursos naturais de água na costa californiana, e a incidência de diferentes doenças em peixes, encontraram uma incidência de 5% de animais afetados por sinais externos de pelo menos uma enfermidade.

Avaliando o stress ambiental a partir de uma série de fontes além dos poluentes, SINDERMANN (1979 e 1980), apontou a influência de diversos fatores físicos - temperatura em especial, sobre ambientes previamente afetados.

A elevação da temperatura ambiental, além de aumentar a solubilidade de compostos químicos na água, e acelerar a maioria das reações químicas - tanto no ambiente como nos organismos presentes, pode resultar num desenvolvimento e crescimento aumentado das populações afetadas, além de acelerar as possíveis respostas patogênicas a eventuais contaminantes presentes.

PICKERING (1981) salienta que alterações em diferentes condições ambientais podem provocar um estado de stress fisiológico nos organismos que ocupam o local afetado; observando que existem respostas fisiológicas que são determinadas por fatores ambientais específicos, e aparecem de modo semelhante em diferentes espécies animais.

MEYERS et al (1985) através de seus estudos apontam como sendo os principais sinais encontrados em organismos aquáticos afetados por agentes poluentes, a perda de equilíbrio, a descoloração e a morte; ressaltando que todos são evidentemente precedidos por marcadas alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas, passíveis de serem analisadas por diferentes técnicas e procedimentos.

FANTA et al (1989) por sua vez, ressaltam que os peixes, de uma maneira geral, tem uma relativa tolerância às variações ambientais, que depende, ao menos em parte, da habilidade individual do animal afetado em acionar e regular processos estabilizantes adequados para que ele possa acompanhar tais alterações, através de adaptações fisiológicas e comportamentais condizentes.

MOLLER (1985) também teve sua atenção voltada para o impacto da poluição sobre a saúde dos peixes, baseando-se no fato de que a maioria dos poluentes pode provocar doenças, aumentar a mortalidade e diminuir a rentabilidade comercial dos cardumes afetados. O pesquisador, assim como SINDERMANN (1980) e OVERSTREET (1988), ressalta a dificuldade em caracterizar a poluição como sendo a causa ou um fator agravante nas doenças ictiológicas, uma vez que fatores múltiplos interagem sobre o quadro clínico analisado, o que pode até mesmo inviabilizar a correta relação entre causa e efeito.

De um modo geral, os pesquisadores, colocados frente a um sem número de casos de contaminação ambiental a cada ano, vem sofrendo, segundo LITTLE (1978) uma pressão crescente para que promovam análises seguras a respeito dos efetivos potenciais das centenas de agentes químicos lançados regularmente ao ambiente.

O uso de bioensaios com peixes para o monitoramento da contaminação ambiental por pesticidas, encontra defensores já na década de sessenta, com os trabalhos de JOHNSON (1968).

Segundo CAMPBELL et al (1974) e STICH et al (1976), os peixes poderiam ser usados como bioindicadores econômicos e sensíveis em estudos de larga escala, na carcinogênese química ou de metabólitos carcinogênicos. Diversos pesquisadores sugerem que ceca de 80 a 85% dos neoplasmas humanos poderiam ser prevenidos se os agentes carcinogênicos responsáveis pudessem ser identificados e removidos de ambientes ocupados pelo homem.

De acordo com MOLLER (1985) diversas doenças ictiológicas poderiam vir a ser monitoradas e usadas como indicadores seguros das condições ambientais da água testada.

HARSHBARGER (1986) sugeriu a estandarização de bioensaios com embriões de peixes para a análise de extratos de efluentes, sedimentos ou biota residente, para a proibição de descartes futuros em pontos que apresentem fontes causadoras de hepatomas ou anormalidades no desenvolvimento.

HANSEN (1984) aponta a razoável confusão existente no que diz respeito ao assessoramento dos efeitos de poluentes em animais indicadores, devido às diferentes respostas que estes podem apresentar, uma vez que a sensibilidade aguda dos animais a diferentes compostos tóxicos varia mais entre diferentes espécies do que entre indivíduos de uma mesma espécie, dentro de uma mesma faixa etária; apesar de variar grandemente entre os diferentes estágios de vida numa mesma espécie. Logo, a escolha da espécie indicadora ideal a ser utilizada nos bioensaios deve ser bem cuidadosa.

PATON et al (1984) e HAWKINS et al (1987) observaram que, mesmo quando uma espécie adequada é escolhida como bioindicadora, suas respostas agudas e crônicas a diferentes compostos tóxicos variam de acordo com outros fatores, como as condições físico-químicas do ambiente aquático (temperatura, pH, salinidade, disponibilidade de oxigênio dissolvido) e outras, intrínsecas aos animais afetados, como a resistência individual, a predisposição genética do indivíduo ou da espécie; além da ocorrência ou não de relacionamentos sinérgicos entre os compostos químicos presentes no local.

Ainda com respeito à escolha do material biológico para bioensaios, SPRAGUE (1973) sugeriu que, de preferência, a opção recaísse sobre espécies nativas, de ocorrência frequente em ambientes naturais passíveis de contaminação pelos componentes químicos analisados.

Segundo as recomendações do "WATER QUALITY CRITERIA" (1972), os bioensaios utilizando animais aquáticos devem ser simples, de uso universal, passíveis de repetições, rápidos, entre 48 e 96 horas, e usados para medir diretamente os efeitos subletais dos contaminantes analisados sobre o crescimento, reprodução, velocidade de natação e frequência respiratória; através de análises específicas das alterações fisiológicas, bioquímicas e histológicas dos animais testados.

HAUX et al (1988) ressaltam que a demanda de ensaios biológicos sensíveis e específicos para testar efeitos de poluentes sobre populações de peixes, induziu recentemente ao desenvolvimento de métodos analíticos sofisticados, decorrentes do conceito geral, quando do uso de bioensaios, de que os

efeitos ecológicos gerais dos poluentes sobre os diversos ecossistemas, originam-se primariamente de alterações em reações bioquímicas correntes nos organismos presentes nos locais afetados.

O presente trabalho, baseando-se na elaboração de um bioensaio controlado, procurou elucidar, em laboratório, o quadro de intoxicação subaguda de peixes, quando expostos ao herbicida hormonal fenoxiacético BI-HEDONAL.

A espécie escolhida, *Prochilodus scropha*, nativa e de ocorrência frequente no estado do Paraná, já foi vítima de exposições acidentais em seu habitat a herbicidas do mesmo grupo químico (MERLIN et al, 1990; MEDINA et al, 1991), sendo portanto, comprovadamente suscetível ao composto testado.

O *P.scropha*, ou Curimatá, é de relativa significância nas bacias hidrográficas paranaenses; que, segundo o Relatório Técnico SUREHMA (1984) receberam, naquele ano, um descarte aproximado de 62 mil quilogramas dos princípios ativos contidos no herbicida testado (2,4-D e MCPA); fato que comprova e atesta a relevância do presente estudo.

O 2,4-D ou ácido (2,4-diclorofenoxi)acético, (IUPAC), é um composto químico sintético, obtido a partir de pelo menos tres processos laboratoriais, segundo POKORNY (1941); FOSTER (1945); HASKELBERG (1947), MANSKE (1949) (ver THE MERCK INDEX, 1968).

Em sua forma ácida ($C_8H_6Cl_2O_3$) apresenta-se sob a forma de pó branco, pouco solúvel em água; enquanto as formas salinas aminadas e as esterificadas apresentam maior solubilidade naquele veículo, sendo, portanto, as formas fenoxiacéticas mais usadas comercialmente.

Desde a primeira descrição dos efeitos potenciais dos sais de 2,4-D sobre o crescimento vegetal (ZIMMERMANN et al, 1942 - ver PESTICIDES, 1962), os compostos fenoxiacéticos vem sendo usados como potentes herbicidas. Dentre todos, o 2,4-D e o 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético - IUPAC) são os compostos fenoxiacéticos de uso comercial mais frequente e difundido.

Atualmente, estes dois fenoxiacetatos estão disponíveis no mercado de agroquímicos sob pelo menos 30 marcas comerciais registradas (PESTICIDES, 1962); seja em suas formas simples ou em misturas com outros compostos químicos (TABELA 1.2).

Os fenoxiacetatos são, do ponto de vista funcional, considerados como auxinas sintéticas, e classificados como herbicidas hormonais, apesar de serem quimicamente diversos da auxina mais conhecida, o ácido indolil-3-acético ou IAA, o hormônio de crescimento mais difundido entre as diferentes classes vegetais.

TABELA 1.2 COMPOSTOS FENOXIACÉTICOS COMERCIALIZADOS ATUALMENTE

A. HERBICIDAS FENOXIACÉTICOS QUE CONTÉM 2,4-D EM SUA FORMULAÇÃO COMERCIAL

AGRICORN
FERMIMINE
D 50
ESTERON GE
QUINOXONE
PLANOTOX
ESTERON 40
CHARDOL
CLOROXONE
ERBITOX S
ESTERON 76 BE
PENNAMINE D7
FÓRMULA 40

B. HERBICIDAS FENOXIACÉTICOS QUE CONTÉM 2,4-D MISTURADOS A OUTROS PESTICIDAS EM SUA FORMULAÇÃO COMERCIAL.

ACTRIL DS
BANVEL K
BIO LAW WEEDKILLER
GESAPAX H
HYTROL
LANDMASTER
NETTLE-BAN
PREMOL B
ROLOF H
TORDON
BI-HEDONAL
BUTOXONE
GESAPRIN D
KLYNOPALM
MODOW DG
POLYMONE GO
PRIMATOL AD
SPONTOX

FONTE: PESTICIDES, 1962.

Segundo MEYER et al (1983), os hormônios vegetais de crescimento, como as auxinas, atuam sobre diferentes pontos do metabolismo vegetal, implicando em efeitos a nível da síntese e mecanismo enzimático; e, como todos os hormônios, tem seus efeitos diretamente relacionados com a dose do composto presente no vegetal.

Segundo ROBERTSON et al (1970), pequenas doses hormonais - ou de compostos sintéticos de comportamento hormonal auxínico - estimulam o crescimento e desenvolvimento vegetal; enquanto doses maiores tem um efeito inibitório sobre alguns processos celulares, provocando distorções morfológicas em folhas, caules e raízes; descoloração das folhas, formação de galhas (tumores vegetais) e intensa proliferação celular nos pontos de maior contato, como o mesófilo das folhas e os tubos floemáticos.

Diversos autores, relacionados por aquele pesquisador, mostraram que o 2,4-D, além do Aminotriazole, da Hidrazina Maleica e da mistura comercial Picloran + 2,4,5-T são potencialmente móveis nos organismos animais; o 2,4-D entra facilmente na célula vegetal, e chega a altas concentrações no protoplasma, alcançando posteriormente os vacúolos.

Segundo ERNE (1966) o metabolismo de eliminação dos ácidos clorofenoxiacéticos em tecidos vegetais tem sido objeto de numerosos estudos. O destino destes compostos em tecidos animais, entretanto, não tem sido devidamente analisado, e poucos trabalhos referem-se especificamente aos efeitos dos ácidos clorofenoxiacéticos 2,4-D e MCPA.

ERNE (1966) analisando a distribuição e eliminação de compostos fenoxiacéticos (2,4-D e 2,4,5-T) em aves (galinhas) e mamíferos (ratos e porcos) sob condições de administração laboratorial - dose oral única e doses orais prolongadas, encontrou dados interessantes a respeito do comportamento destes compostos químicos em organismos animais.

Em todos os animais usados pelo pesquisador, o pico de concentração plasmática para o 2,4-D foi atingido em poucas horas (galinhas: 2 horas; mamíferos: entre 4 e 7 horas), com ampla distribuição do composto por todo o corpo; apresentando os níveis teciduais mais elevados nos órgãos de excreção, como fígado e rim; e os mais baixos no cérebro e gordura corpórea.

Além disto, os dados percentuais do trabalho sugerem a penetração do composto para dentro das células, evidenciando a permeabilidade de células sanguíneas (10-20% de 2,4-D do nível plasmático) ao composto.

A eliminação dos fenoxiacetatos também foi rápida, em torno de 72 horas, sendo menor para os tecidos que para o plasma. A principal rota de excreção observada foi a renal.

Não foi registrada a retenção do composto 2,4-D pelos tecidos de mamíferos tratados (CLARK, 1964 - ver ERNE, 1966). Esta informação foi refutada por BERNDT et al (1973), que afirmou a

tendência do 2,4-D em se acumular nos rins de mamíferos tratados, através de mecanismos de transporte ativo não mencionados.

Em discussão a respeito da metabolização dos compostos fenoxiacéticos em organismos animais ERNE (1966) menciona a eliminação do 2,4-D; MCPA e 2,4,5-T em sua forma intacta pela urina dos diferentes mamíferos testados. Segundo o pesquisador, apenas os compostos 4-fenoxibutíricos (2,4-TB; MCPB; ácidos W-fenoxibutírico e capróico) sofreram B-oxidação parcial no rúmen de bois tratados, comprovada pela presença de ácido fenoxiacético livre na urina .

KUKOWICZ-RATAJCZACK et al (1988) e TARARTUCH et al (1990) dedicaram-se à análise da atividade nefrotóxica dos compostos fenoxiacéticos em mamíferos (ratos Wistar).

O primeiro grupo de pesquisadores avaliou o efeito do 2,4-D sódico sobre a função renal de cobaias; o grupo seguinte utilizou a mistura comercial Tordon (2,4-D + Picloram) para uma análise semelhante.

KOSCHIER et al (1976 e 1979) encontraram uma dose dependência direta para exposições de mamíferos a compostos fenoxiacéticos; com altas doses de 2,4-D exercendo significativa influência sobre a função renal dos animais tratados; enquanto que doses pequenas mostraram-se praticamente inofensivas.

Os dados obtidos por KUKOWICZ-RATAJCZAK et al (1988) com a administração de doses subletais sucessivas de 2,4-D em solução sódica a mamíferos (ratos) apontam para um quadro de comprometimento renal típico de compostos nefrotóxicos severos, com depressão da filtração glomerular, aumento da concentração de uréia no sangue e urina, e ausência de cetoaciduria, aminoaciduria e proteinuria; embora sem indicação funcional de danos aos túbulos proximais.

Em paralelo, os pesquisadores encontraram um quadro de aumento da diurese e da excreção de íons de sódio, sem comprometimento funcional dos túbulos; sintomas típicos do uso de diuréticos chamados “de alça”.

De um modo geral, os resultados obtidos por TARARTUCH et al (1990) com a mistura comercial Tordon (2,4-D + Picloram), registraram, como o 2,4-D sódico, um moderado potencial nefrotóxico sobre a hemodinâmica glomerular e sobre o sistema de transporte de eletrólitos no néfron, indicando ser a alça de Henle o provável sítio de ação do 2,4-D no rim de mamíferos tratados.

MERLIN et al (1990) realizaram análises histológicas da ação da mistura clorofenoxiacética comercial Tordon (2,4-D + Picloram) sobre o fígado e o rim de peixes (curimatás e bagres), aves (galinhas) e mamíferos (ratos e ovelhas).

Com a administração oral prolongada de solução aquosa da mistura comercial Tordon, os pesquisadores obtiveram resultados semelhantes para os diversos grupos animais testados.

As principais alterações morfológicas no fígado dos animais testados incluíram modificações no padrão morfológico celular e de distribuição dos hepatócitos, incluindo o aparecimento de células isoladas, binucleadas e hipertrofiadas, junto com descolamento celular e perda do aspecto compactado do tecido; além de necrose em diferentes níveis.

Os rins apresentaram atrofia, descolamento e necrose do epitélio tubular, aliados a um processo infiltrativo linfoplasmocitário crônico.

MEYERS (1982) em levantamento bibliográfico conseguiu demonstrar que as principais lesões histológicas produzidas pelos fenoxiacetatos não são específicas para estes compostos, mas provocadas também por outros herbicidas e inseticidas.

COPE (1970) relatou ruptura de hepatócitos com perda de glicogênio, e acentuada distorção do padrão de organização dos cordões hepáticos em *Lepomis macrochirus* provocados pelo 2,4-D. As mesmas lesões, entretanto, de acordo com MEYERS (1982) são apontadas por outros pesquisadores como tendo sido provocadas pelos inseticidas organoclorados Heptacloro, Metoxicloro, Lindane e pelo herbicida clorado Silvex (WALSH, 1975).

Os trabalhos de WALSH (1975) com salmonídeos, relatam quadros de hiperemia, degeneração gordurosa e congestão de sinusóides e veias, provocados pela exposição ao 2,4-D; aos inseticidas organoclorados DDT e Dieldrin; aos organofosforados Malation e Metil-Paration e ao inseticida carbamatado Carbaril.

HENDRICKS (1979) encontrou degeneração e hipertrofia de hepatócitos, com necrose em diferentes níveis em carpas expostas à mistura comercial Tordon. MEYERS (1982) relaciona os trabalhos de diversos pesquisadores que obtiveram as mesmas lesões em espécies diferentes de peixes, provocados por outros compostos químicos. Entre eles estão os herbicidas Dowicide, Dinoseb, Diquat e Paraquat (HENDRICKS, 1979); Dowpon e os inseticidas organoclorados DDT (KING, 1962; MATHUR, 1962); Lindane (WALSH, 1975; MATHUR, 1975); Endrin (COUCH, 1975); Dieldrin (MATHUR, 1962); Heptacloro (ANDREWS, 1966) e Metoxicloro (WALSH, 1975; COPE, 1966).

Os trabalhos de COLLINS et al (1971) e SCHÜTZ et al (1990) avaliaram o potencial teratogênico de compostos fenoxiacéticos em mamíferos.

O primeiro grupo avaliou a teratogenicidade de diferentes formulações comerciais de 2,4-D e 2,4,5-T; e não encontrou alterações teratogênicas significativas em hamsters, apesar de ter obtido um decréscimo significativo na viabilidade fetal, notadamente com as doses mais elevadas.

O segundo grupo de pesquisadores realizou a avaliação comportamental de ratos Wistar expostos à mistura comercial Tordon durante a gestação e lactação. Os dados obtidos sugeriram danos permanentes ao sistema nervoso central dos filhotes, em estruturas envolvidas no equilíbrio.

Com respeito aos efeitos sobre a bioquímica celular dos herbicidas hormonais fenoxiacéticos, o trabalho de ROBERTSON et al (1970) é de grande relevância ao focar tais efeitos sobre a célula vegetal. Os pesquisadores enfatizaram a análise nos fenoxiacetatos comercialmente mais utilizados como herbicidas, 2,4-D; 2,4,5-T; MCPA; MCPB e trataram de princípios bioquímicos gerais do metabolismo energético celular, comuns aos grupos animal e vegetal.

Em sua revisão literária, os pesquisadores mencionam MORELAND (1967) ao abordar o envolvimento de compostos fenoxiacéticos na respiração celular, na fotossíntese e na síntese de proteínas de células vegetais.

Com relação aos efeitos dos fenoxiacetatos sobre a respiração celular, um fenômeno comum às células vegetais e animais, os autores relacionaram os trabalhos de diversos pesquisadores que apontam a atuação do 2,4-D como agente desacoplador e/ou inibidor da oxidação de diversos compostos, num processo que resulta no deslocamento da fosforilação oxidativa.

Entre os trabalhos relatados, cumpre destacar os experimentos de WEDDING et al (1961), com células intactas da alga cianofícea *Chlorella*; BRODY (1952) com mitocôndrias isoladas de fígado de ratos e lobos; LOLITKAR (1960), BOTIRILL (1965) com mitocôndrias isoladas de diferentes vegetais.

Todos estes trabalhos apontam para um acentuado efeito inibitório do 2,4-D sobre a atividade respiratória mitocondrial, com provavelmente mais de um ponto de atuação sobre o processo global.

Ainda em sua revisão literária, ROBERTSON et al (1970) relata os trabalhos de FREED et al (1961) demonstrando que baixas concentrações de 2,4-D estimulam a atividade enzimática do Ciclo de Krebs, enquanto que doses mais elevadas inibem as mesmas reações.

Tais resultados foram confirmados por WEDDING (1962), também mencionado por aqueles pesquisadores, ao identificar as enzimas envolvidas no processo inibitório. São elas, a Isocitrato-desidrogenase, enzima que cataliza a oxidação do Isocitrato a alfa-Cetoglutarato no Ciclo de Krebs; e a Malato-desidrogenase, catalizadora da oxidação do Malato a Oxalacetato no mesmo processo. Ambas as reações ocorrem em presença de NAD^+ como aceptor ativo de elétrons.

As duas enzimas estão localizadas na membrana mitocondrial externa (WOLD, 1975; LEHNINGER, 1976), o que corrobora com os dados de PICKERING (1965) e ERNE (1966) que atestam a penetração dos fenoxiacetatos nas células e organelas celulares.

Estudos posteriores, relatados por ROBERTSON et al (1970), sugerem a ligação do 2,4-D com a molécula de NAD, formando um complexo inativo, não enzimático, que reduz a atuação do composto na acepção dos elétrons liberados durante o Ciclo de Krebs.

Os mesmos pesquisadores propoem uma hipótese, na tentativa de explicar o efeito dose-dependente do 2,4-D sobre as enzimas mencionadas. A proposta é a de que o 2,4-D ligue-se fisicamente à proteína enzimática, de tal modo que, quando em baixas concentrações, aumente a atividade catalítica da enzima, e, quando em doses maiores, diminua esta atividade.

Os trabalhos de SMITH et al (1966) sugerem outro ponto de atuação dos fenoxiacetatos na respiração mitocondrial, a enzima Ubiquinona, pertencente ao complexo enzimático da Ubiquinona-reductase, envolvida no processo de elétron-transferência do Ciclo de Krebs.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1 Biologia do *Prochilodus scropha*

O animal utilizado no presente estudo foi o *Prochilodus scropha*, peixe teleósteo cipriniforme da família Prochilodontidae, vulgarmente conhecido como Curimbatá, Curimba ou Curimatã; em idade juvenil, de 4 a 15 meses, com tamanho médio variando entre 7,0 e 12,0 cm.

O Curimbatá tem larga distribuição pelo território nacional, e habita principalmente a grande bacia do Rio Paraná.

A espécie é muito frequente nos estados de Mato Grosso, Paraná e São Paulo, onde, segundo CARVALHO et al (1990) ocupa o primeiro lugar em relação à biomassa na composição da ictiofauna da represa de Jurumim, no Rio Paranapanema/SP.

De acordo com JULIO et al (1990), a espécie é uma das cinco numericamente mais importantes na composição da ictiofauna de regiões alagadiças do Rio Paraná/PR.

O Curimbatá, espécie de piracema, vem se mostrando viável para utilização em sistemas de cultivo comercial e programas de povoamento e repovoamento de rios e represas.

São peixes de fundo e alimentam-se de detritos e microorganismos presentes no lodo. Em cativeiro, aceitam ração, e chegam a pesar 1.200 g e atingir o comprimento de 35 cm quando adultos.

Em ambiente natural, a espécie reproduz-se entre os meses de Dezembro a Fevereiro, e está sexualmente madura em dois anos.

2.1.2 Coleta, Transporte e Manejo

Os exemplares de *P. scropha* utilizados foram coletados na Estação de Piscicultura de Capivari-Cachoeira, de propriedade e responsabilidade da Companhia Paranaense de Energia Elétrica - COPEL, situada na BR 116, no município de Campina Grande do Sul/PR, distante cerca de 100 km da capital do estado.

Os animais, em idade juvenil - entre 4 e 15 meses - foram obtidos a partir de uma mesma desova laboratorial, rotineira àquela estação, e foram coletados manualmente com o auxílio de redes e puçás diretamente aos aquários e tanques de crescimento; em tres lotes de aproximadamente 200 animais cada, em diferentes épocas ao longo do experimento.

Após coletados, os animais foram acondicionados em sacos plásticos preenchidos com água do local e oxigênio saturado. O transporte até Curitiba foi por via terrestre, com sobrevivência de 95% dos espécimes ao final desta etapa.

Durante o período de aclimação dos animais às condições laboratoriais (três semanas), os peixes foram distribuídos equitativamente em dois aquários de 250 l; com água obtida a partir da rede de distribuição municipal, previamente filtrada em filtros de celulose e carvão ativado, e dechlorada por aeração.

Cada aquário-estoque recebeu um sistema de filtragem biológica por placas, mantido no fundo sob uma espessa camada de cascalho e foi mantido tampado com placas de isopor.

O pH da água permaneceu estável em $7,3 \pm 0,1$ e a temperatura mantida em $26 \text{ C} \pm 2 \text{ C}$ por efeito de um sistema termostato-aquecedor elétrico.

A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes individuais de 20 W, num fotoperíodo de 14/10 horas dia/noite.

A alimentação, à base de ração, foi fornecida uma vez ao dia, às 10:00 horas, cinco vezes por semana, conforme as recomendações de SPRAGUE (1973).

A composição básica da ração fornecida (Nuvital, específica para o crescimento de carpas) é de milho gelatinizado, farinha de torta de soja, farinha de peixe, subprodutos não especificados de trigo, fermento de cervejaria dessecado, ortofosfato bicálcico, carbonatos de sódio e magnésio, sal, suplementos e aditivos.

2.2 BIOENSAIOS

O presente estudo levou a termo tres baterias de bioensaios, com propósitos diversos e consecutivos, conforme discriminado a seguir.

A - A determinação do TLm ou Limite de Tolerância Média do **P.scropha** ao herbicida Bi-Hedonal (2,4-D + MCPA), a partir da obtenção da LC₅₀ ou Concentração Letal Média do herbicida para a espécie; numa bateria de testes exploratórios sob a forma de bioensaio estático, segundo as recomendações do STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (1960); WATER QUALITY CRITERIA (1972) e SPRAGUE (1973), para testes de efluentes químicos e industriais em laboratórios.

B - Análise da capacidade respiratória dos hepatócitos de exemplares de **P.scropha** expostos subletalmente ao herbicida Bi-Hedonal, num bioensaio estático segundo SPRAGUE (1973), avaliado e conduzido a até 120 horas após o início da exposição.

C - Avaliação morfológica do fígado de exemplares de **P.scropha** expostos subletalmente ao herbicida Bi-Hedonal, num bioensaio estático segundo SPRAGUE (1973), avaliado e conduzido a até 120 horas após o início da exposição.

2.3 METODOLOGIA

2.3.1 Concentração Letal Média

Durante a execução dos bioensaios analisados pelo presente estudo, foram mantidas estáveis as condições ambientais nos aquários-teste e no laboratório, com o intuito de minimizar a interferência de fatores alheios aos analisados sobre as respostas dos animais.

A notação LC_{50} ou Concentração Letal Média, normalmente é usada para ensaios de campo, e é, segundo SPRAGUE (1973), a mais adequada para os ensaios laboratoriais que envolvam a exposição dos animais experimentais a contaminantes diluídos em água, e equivale numericamente à TIm ou Limite de Tolerância Média, de aceitação e aplicação mais difundida.

Os testes foram realizados em duas etapas; a primeira, exploratória, teve o objetivo de definir a faixa de concentrações potencialmente ativas do herbicida. A segunda, ateu-se à análise mais detalhada das quatro concentrações mais efetivas, considerando-se o resultado pretendido.

Para a realização dos testes exploratórios, foi montado um sistema de banho-maria para quatro recipientes plásticos com volume individual de 2 l. Cada recipiente recebeu um litro de água filtrada e decolorada, dois animais de tamanho aproximado e cânula individual de aeração.

A temperatura do conjunto foi mantida em torno dos 26 C, por um sistema termostato-aquecedor elétrico acoplado ao aquário externo; o fotoperíodo mantido foi de 14/10 horas dia/noite.

A faixa de concentrações testada foi dividida em tres baterias com um grupo controle cada, conforme TABELA 2.1.

A exposição foi feita por diluição do herbicida em sua formulação comercial diretamente na água de cada recipiente teste.

No teste seguinte, foi feita a repetição do experimento, usando-se as diluições de resposta intermediária entre 0 e 100% de mortalidade, registradas no teste exploratório.

Assim, foram reavaliadas as diluições de 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 ml/l do herbicida, em recipientes de maior volume (40 l) e com uma densidade populacional maior, de 6 animais. As demais condições foram mantidas como no teste exploratório.

Para ambos os ensaios, os animais foram coletados aleatoriamente aos aquários-estoque, e não foram alimentados durante todo o teste, bem como nas 24 horas anteriores a seu início.

O tempo total do bioensaio foi de 120 horas, e a água dos recipientes-teste (e controles) foi substituída integralmente a cada 24 horas, por igual volume de água nas mesmas condições ambientais e de diluição anterior.

As leituras de mortalidade foram registradas a cada 24 horas, e o resultado transferido para tabelas de leitura.

A mortalidade entre os grupos controle foi nula nos dois ensaios, assegurando a qualidade dos resultados obtidos.

TABELA 2.1 DILUIÇÕES DO HERBICIDA BI-HEDONAL (2,4-D + MCPA) UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DA DL₅₀ PARA O *P.scropha*.

BATERIA I	
Grupo Controle	
Teste 1 = 0,03 ml/l de herbicida diluído	
Teste 2 = 0,05 ml/l de herbicida diluído	
Teste 3 = 0,07 ml/l de herbicida diluído	
BATERIA II	
Grupo Controle	
Teste 4 = 0,1 ml/l de herbicida diluído	
Teste 5 = 0,3 ml/l de herbicida diluído	
Teste 6 = 0,5 ml/l de herbicida diluído	
BATERIA III	
Grupo Controle	
Teste 7 = 1,0 ml/l de herbicida diluído	
Teste 8 = 1,5 ml/l de herbicida diluído	
Teste 9 = 2,0 ml/l de herbicida diluído	

2.3.2 - Exposição ao Bi-Hedonal

Peixes *P.scropha* em idade juvenil foram intoxicados com Bi-Hedonal, um herbicida hormonal fenoxiacético da marca BAYER DO BRASIL, que consiste na mistura de dois compostos fenoxiacéticos, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, PM 221,04, em sua forma de sal dimetilamina, equivalente a 275 g/l do ácido livre) e MCPA (ácido 2-metil, 4-clorofenoxiacético, PM 200,63 em sua forma de sal dimetilamina, equivalente a 275 g/l de ácido livre).

O meio de exposição adotado foi o da diluição do produto comercial diretamente nos aquários-teste, mantido sob condições ambientais controladas.

Com o intuito de aproximar o bioensaio das condições de campo, foi adotado o recurso da exposição limitada dos animais ao contaminante, uma vez que, em ambiente natural, o eventual acesso de pesticidas aos cursos de água é esporádico e intermitente, decorrente de sua aplicação em lavouras próximas, e tem sua permanência no local de despejo influenciada por fatores físico-químicos e pela velocidade do fluxo da água no local atingido.

Assim, a exposição laboratorial dos animais foi feita por diluição de uma dose subletal (0,05 ml/l) do herbicida Bi-Hedonal, obtida a partir da determinação da T_{lm} ou Limite de Tolerância Média para a espécie, diretamente na água dos aquários-teste.

Os aquários foram mantidos sob condições ambientais controladas e idênticas, e a exposição dos animais ao contaminante foi limitada a 24 horas, período após o qual os animais foram transferidos para outros recipientes sob as mesmas condições experimentais, porém desprovidos de qualquer quantidade do produto químico testado; ambiente no qual permaneceram até o final do ensaio.

Para a avaliação do comprometimento respiratório mitocondrial hepático dos animais contaminados, procederam-se 16 baterias individuais de intoxicação, sendo duas para cada coleta pré-determinada do material destinado à análise bioquímica, nos seguintes tempos de ensaio: 2 , 4 , 24 , 48, 72 , 96 e 120 horas de exposição.

Em cada bateria de intoxicação, 26 animais foram dispostos em dois aquários de 40 l de água filtrada e dechlorada por aeração, mantidos sob aeração constante e temperatura controlada de 26 C +- 2

C e fotoperíodo de 14/10 horas dia/noite, aos quais foi acrescido o herbicida Bi-Hedonal em diluição de 0,05 ml/l.

Os animais mantiveram-se em contato com o contaminante por 24 horas, após o que foram transferidos para recipientes com água não contaminada, sob as mesmas condições laboratoriais e ambientais anteriormente utilizadas e descritas.

O controle da avaliação bioquímica foi feito a partir da coleta de material biológico em animais submetidos ao mesmo manejo de transferência dos animais teste.

Para a avaliação do comprometimento morfológico das estruturas hepáticas dos animais contaminados, procedeu-se a uma bateria de intoxicação, usando-se 18 exemplares de *P.scropha* de tamanho aproximado e em boas condições sanitárias, divididos em dois grupos de 9 exemplares cada e dispostos em dois aquários de 40 l, mantidos sob as mesmas condições anteriormente mencionadas.

O primeiro grupo foi exposto a 0,05 ml/l do herbicida hormonal fenoxiacético Bi-Hedonal por 24 horas; o segundo grupo não foi exposto ao contaminante, e permaneceu como controle do experimento.

Após 24 horas do início da exposição, ambos os grupos foram transferidos para recipientes com água não contaminada, e mantidos sob as mesmas condições ambientais anteriormente descritas.

2.3.3 Experimentação Bioquímica

Para a determinação da velocidade e consumo líquido de oxigênio por mitocôndrias isoladas de *P.scropha* expostos experimentalmente a 0,05 ml/l do herbicida hormonal fenoxiacético Bi-Hedonal (2,4-D + MCPA) diluído diretamente na água do aquário, foi utilizada a técnica gasométrica clássica de Warburg.

Frações purificadas e metabolicamente ativas de mitocôndrias foram obtidas a partir de homogenados celulares de pequenos fragmentos de fígado, em meio de extração (0,21 M Manitol; 0,01 M TRIS-HCl; 0,01 M EDTA; pH 7,4) à temperatura de 4 C.

Os órgãos foram extraídos de um pool de 26 animais a cada análise, após sacrifício mediante incisão na coluna vertebral ao final da cabeça, e rapidamente imersos na solução tamponada de pH 7,4 anteriormente mencionada.

Depois de coletados, os órgãos foram picados e homogenizados em homogenizador Potter-Ejvehjem acoplado a motor de rotação, em meio de extração de pH 7,4 à temperatura de 4 C (FIGURA 2.1).

O homogenado, submetido ao processo de centrifugação diferencial, foi centrifugado a 1.000 g por 10 minutos, após o que a fração sobrenadante foi ressuspensa em solução tamponada pH 7,4 e novamente centrifugado, desta vez a 10.000 g por 20 minutos.

As mitocôndrias foram destinadas no Respirômetro de Warburg, a 30 C por duas horas.

Para a avaliação respirométrica mitocondrial dos animais intoxicados, foram montados seis sistemas frasco/manômetro; tres endógenos e tres experimentais, acrescidos de Succinato 0,5 M como substrato adicionado, de acordo com a sugestão de SNELL et al (1987).

Para o sistema Endógeno, destinado à medida do consumo de oxigênio necessário para a degradação das reservas intracelulares do tecido homogenado, foram preparadas tres sistemas, cada qual contendo no frasco de Warburg, 2,5 ml de solução tampão pH 7,4 (0,01 M TRIS; 0,21 M MANITOL; 0,01 M EDTA); 0,3 ml de suspensão mitocondrial (aproximadamente 1,0 mg de proteína), além de 0,2 ml de KOH a 20% no poço central do frasco.

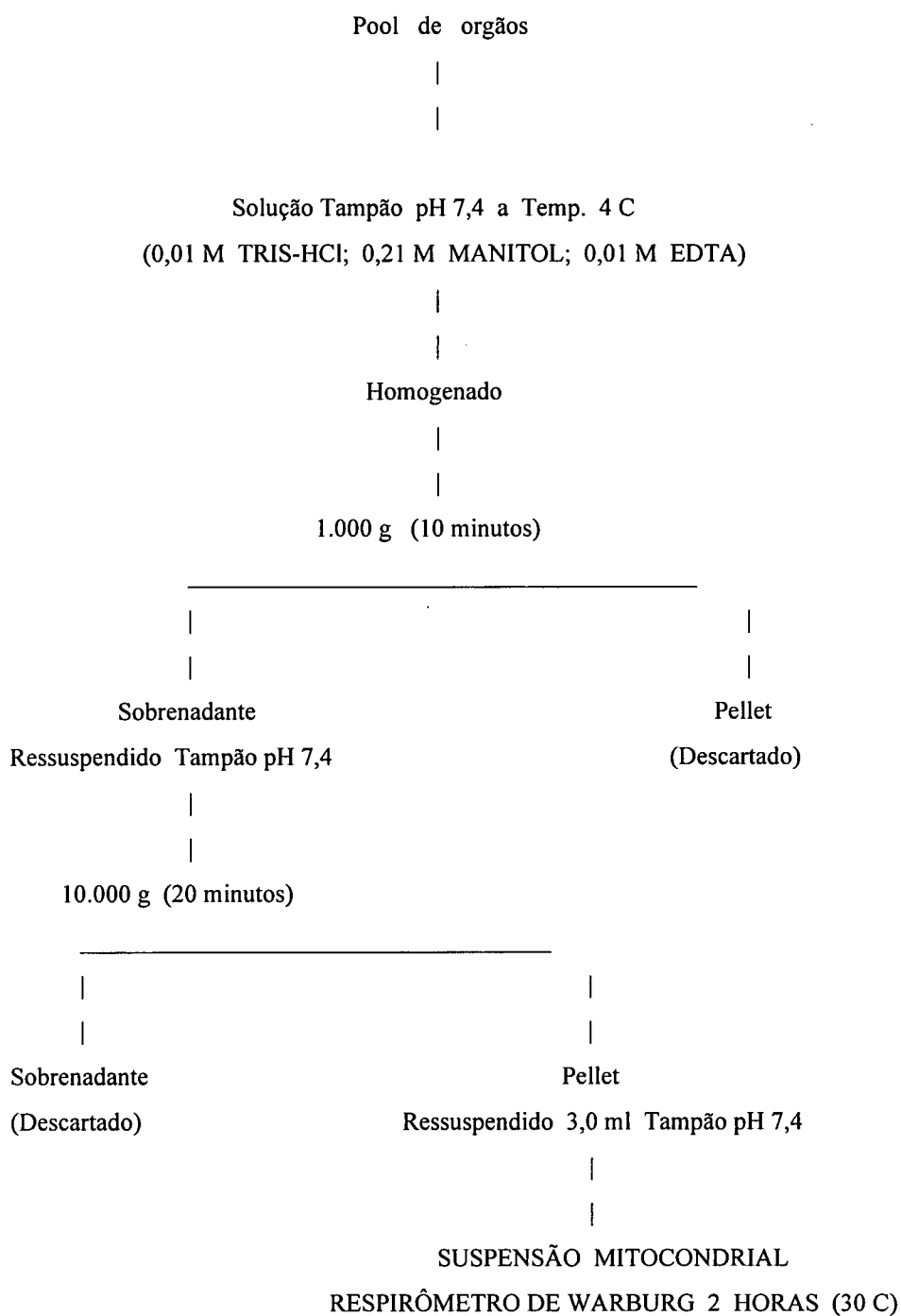
Da mesma forma, o sistema Experimental, destinado à medida do consumo do oxigênio necessário para oxidar o substrato adicionado ao sistema pelo tecido homogenado, contou com tres repetições, cada qual contendo no frasco de Warburg, 2,3 ml de solução tampão pH 7,4 (0,01 M TRIS; 0,21 M MANITOL; 0,01 M EDTA); 0,3 ml de suspensão mitocondrial (aproximadamente 1,0 mg de proteína); 0,2 ml de solução KOH a 20%, contido no poço central de cada frasco e 0,3 ml de Succinato contido no braço lateral de cada frasco de Warburg.

Os dados manométricos de acompanhamento da experimentação foram anotados em planilha de leitura, bem como os cálculos de correção ambiental e de conversão da leitura manométrica nos horários estabelecidos em consumo de oxigênio, dados em μl de O_2 .

Depois de coletados todos os dados de acompanhamento da experimentação, foram proferidos os cálculos para determinação do consumo de oxigênio em μl pelo material biológico estudado; bem como do Quociente Respiratório para o Oxigênio para cada um dos sistemas preparados.

O Quociente Respiratório para o Oxigênio - QO_2 ; obtido a partir da relação entre consumo de oxigênio em μl /conteúdo proteico em mg de proteína para cada sistema testado, quantifica a capacidade de oxidação do material biológico analisado, e reflete instantaneamente qualquer comprometimento enzimático das estruturas envolvidas no processo respiratório mitocondrial.

FIGURA 2.1 - PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO MITOCONDRIAL A SER TESTADA EM RESPIRÔMETRO DE WARBURG



O conteúdo proteico de cada sistema foi determinado segundo o método colorimétrico de LOWRY et al (1951), através do reagente fenólico Folin-Ciocalteu. A leitura da cor desenvolvida foi realizada em espectrofotômetro Beckman DU a 660 nm. A curva padrão de proteína foi executada a partir de albumina sérica bovina a 20%.

Os cálculos para o estabelecimento do Quociente Respiratório para o Oxigênio seguiram as recomendações de VILELLA et al (1973).

A avaliação do QO_2 dos animais intoxicados restringiu-se às primeiras 120 horas após o início da exposição dos animais ao herbicida testado, e envolveu a determinação do Quociente Respiratório nos seguintes tempos: 2; 4; 24; 48; 72; 96 e 120 horas.

Os valores obtidos para o Quociente Respiratório nos diferentes tempos de experimentação foram tabulados em gráficos e relatórios, segundo o programa SUPERCALC III.

2.3.4 Análise Morfológica

2.3.4.1 Coleta do Material para Análises Histológicas

Foram sacrificados por secção medular seguida de decapitação, dois animais de cada vez, sendo um pertencente ao grupo teste e outro do grupo controle, após 2; 4; 24; 48; 72; 96 e 120 horas do início da exposição dos animais-teste ao herbicida testado.

A retirada do órgão de escolha foi feita após abertura longitudinal ao longo do ventre de cada animal e evisceração parcial. Foi retirado o fígado inteiro de cada animal.

2.3.4.2 Metodologia Histológica

Os lóbulos hepáticos foram fixados em Bouin por 12 horas, desidratados em série crescente de álcoois, incluídos em parafina misturada a cêra de abelhas a 10% e cortados em micrótomo tipo Minon a 5 um.

As lâminas histológicas montadas a partir das peças anatômicas foram submetidas a dois procedimentos de coloração: Hematoxilina de Harris/Eosina (ROBERTS et al, 1978 modificado por FANTA, em comunicação pessoal) e Mallory (CULLING et al, 1985), para evidenciação das diferentes estruturas morfológicas.

3 RESULTADOS

3.1 Determinação da Dose Subletal de Bi-Hedonal para *P.scropha*

As diluições de 0,03; 0,05 e 0,07 ml/l do herbicida hormonal fenoxiacético Bi-Hedonal (2,4-D + MCPA) testadas durante o bioensaio experimental de 120 horas, não foram suficientes para provocar a morte dos animais testados.

Por outro lado, as diluições de 1,0; 1,5 e 2,0 ml/l do herbicida provocaram um percentual de 100% de mortalidade durante o mesmo período.

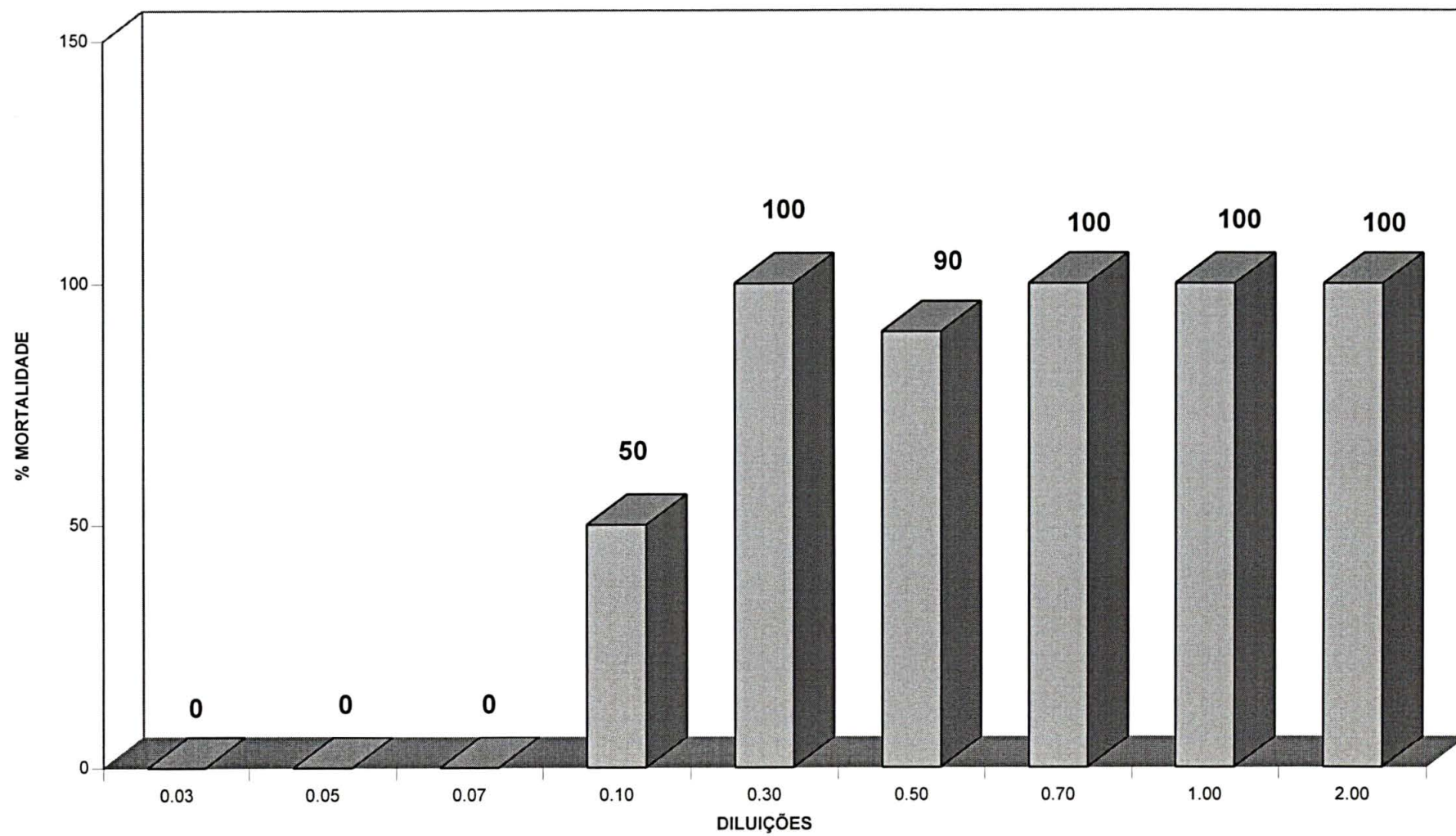
O percentual de mortalidade atingido com as diluições de 0,3; 0,5 e 0,7 ml/l variou entre 90 e 100% dentro das 120 horas avaliadas, tanto no ensaio experimental como na repetição do teste com um maior número de animais.

Os resultados globalizados para as duas repetições estão representados na FIGURA 3.1.

A diluição de 0,1 ml/l do herbicida provocou, em duas repetições experimentais, um índice de 50% de mortalidade para os animais testados, conforme a FIGURA 3.1.

A mortalidade entre os grupos controle foi nula em todos os ensaios.

FIGURA 3.1 - CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA DO BI-HEDONAL PARA *P. scropha*.



3.2 Comprometimento da Capacidade Respiratória de Hepatócitos de *P.scropha* expostos ao Herbicida Bi-hedonal

A interpretação do significado metabólico do consumo gasoso pelo material biológico testado foi obtida a partir do relacionamento entre o consumo de oxigênio e o conteúdo proteico de cada sistema avaliado, através do estabelecimento do Quociente Respiratório para o Oxigênio - QO_2 .

Os valores obtidos de QO_2 nos diferentes tempos de experimentação foram tabulados conforme TABELA 3.1 e, quando comparados ao obtido pelo grupo controle, fornecem dados a respeito da inibição provocada pela exposição ao composto testado, compilados na FIGURA 3.2.

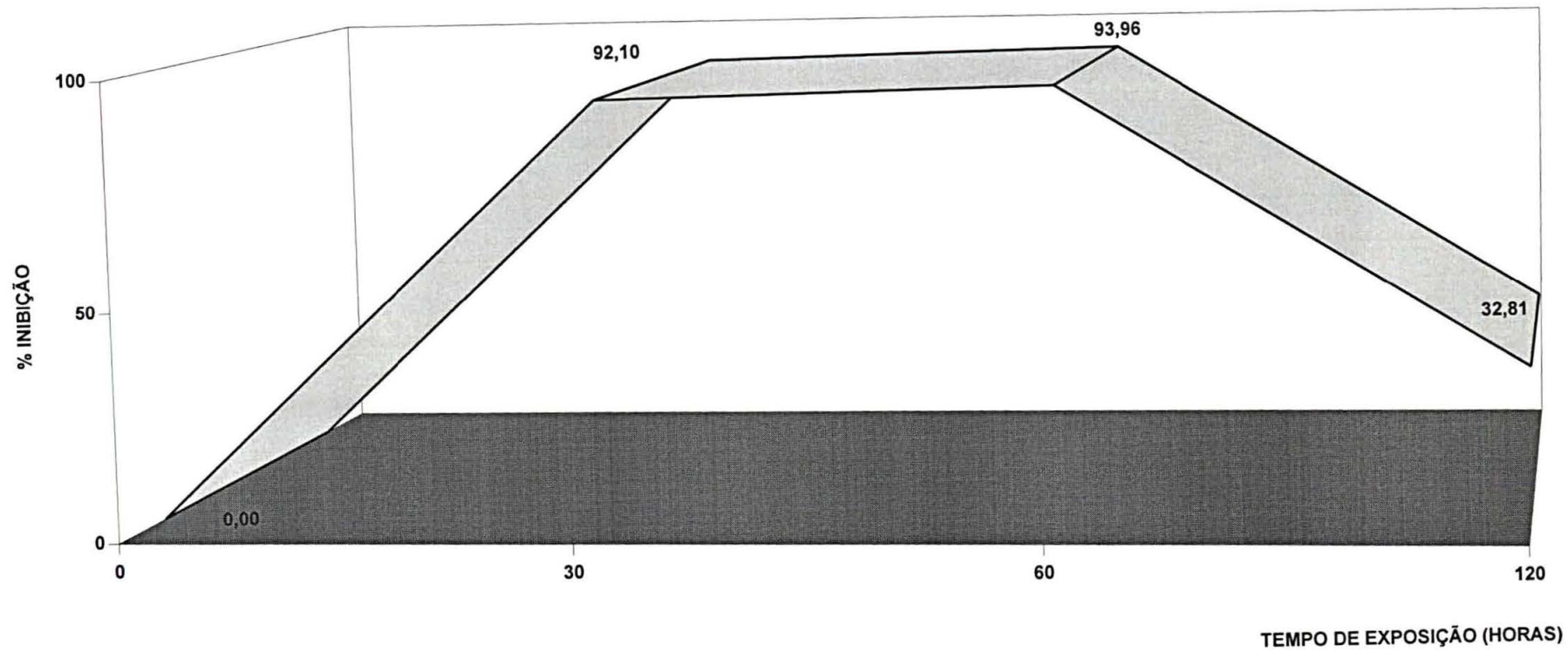
TABELA 3.1 QUOCIENTE RESPIRATÓRIO DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS DE *P.scropha* EXPOSTOS SUBLETALMENTE AO HERBICIDA FENOXIACÉTICO BI-HEDONAL

	QO_2 em 70 minutos (*) ($\mu l O_2/mg$ proteína)	QO_2 EM 130 MINUTOS (*) ($\mu l O_2/mg$ proteína)
CONTROLE	53,79	81,59
2 HORAS	2,79	2,54
4 HORAS	5,55	10,08
24 HORAS	4,25	17,39
48 HORAS	2,41	7,81
72 HORAS	3,25	6,21
120 HORAS	36,14	51,51

Os valores mencionados, correspondem a relação obtida entre o consumo de oxigênio (μl) por quantidade de tecido seco (mg proteína) em 70 e 130 minutos.

Sistema: 2,3 ml tampão pH 7,4 (0,21 M Manitol ; 0,01 M TRIS-HCL ; 0,01 EDTA) ;
0,2 ml KOH a 20%; 0,3 ml Suspensão Mitocondrial; 0,2 Succinato 0,5M.

FIGURA 3.2 - INIBIÇÃO METABÓLICA DE MITOCÔNDRIAS HEPÁTICAS DE *P.scropha* EXPOSTOS SUBLETALMENTE AO BI-HEDONAL.



3.3 Efeito do Bi-Hedonal sobre a Morfologia do Tecido Hepático de *P.scropha*

Foi analisado o efeito do herbicida hormonal fenoxiacético Bi-Hedonal (2,4-D + MCPA) em diluição de 0,05 ml/l, correspondendo a 0,011 M de 2,4-D e 0,010 M de MCPA, sobre a morfologia do tecido hepático de *P.scropha* exposto ao herbicida por 24 horas.

Os animais do grupo controle não apresentaram alterações morfológicas evidentes no tecido hepático.

Após 24 horas de exposição dos animais ao Bi-Hedonal, foi observada uma discreta hipertrofia dos hepatócitos; um início de vacuolização do citoplasma; deslocamento dos núcleos para a periferia da célula; a presença de depósitos intracelulares e de pequenos espaços intercelulares.

Os animais sacrificados 48 horas após o início da exposição apresentaram uma maior vacuolização citoplasmática e um deslocamento nuclear mais evidente, além da presença de grãos castanhos em regiões próximas aos canais biliares e de células sanguíneas retidas nos espaços dos sinusóides.

Após 72 horas de exposição, foi registrada a presença de nucléolos muito condensados e a repetição das lesões já mencionadas, com a evidenciação de uma hipertrofia mais pronunciada.

Nos animais sacrificados a 120 horas após o início da exposição, as lesões se repetiram, porém em menor intensidade do que registrado a 72 e 96 horas do início da exposição.

As alterações morfológicas encontradas foram compiladas conforme TABELA 3.2.

TABELA 3.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO TECIDO HEPÁTICO DE *P. scropha* EXPOSTO SUB-LETALMENTE AO HERBICIDA FENOXIACÉTICO BI-HEDONAL EM DILUIÇÃO DE 0,05 ml/l, NAS PRIMEIRAS 120 HORAS DE EXPOSIÇÃO.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	2	4	24	48	72	120
HIPERTROFIA DE HEPATÓCITO			+	+	++	+
DESLOCAMENTO NUCLEAR			+	++	++	+
VACUOLIZAÇÃO DO CITOPLASMA			+	++	++	+
ESPAÇOS INTERCELULARES			+	+	+	+
CONDENSAÇÃO DE NUCLÉOLOS					+	
GRÃOS CASTANHOS				+	++	+
DEPÓSITOS INTRACELULARES			+	+	+	+
CONGESTÃO CIRCULATÓRIA				+	+	

LEGENDA: (+) REGISTRO POSITIVO DA CARACTERÍSTICA MENCIONADA
 (++) REGISTRO POSITIVO E EM MAIOR INTENSIDADE DA CARACTERÍSTICA MENCIONADA.

4 DISCUSSÃO

Desde a ocorrência de dois acidentes ecológicos envolvendo o descarte de herbicidas fenoxiacéticos em rios bastante povoados, no Mato Grosso e no Paraná , ambos durante o ano de 1988, diversos pesquisadores vem tentando elucidar alguns aspectos do quadro de intoxicação de peixes nativos por compostos daquele grupo químico.

A maioria dos problemas de poluição ambiental envolvem descartes de produtos químicos ou misturas de composição química variável ou desconhecida. Ao atingirem as diferentes populações presentes àqueles locais, tais compostos provocam nelas respostas que variam segundo características intrínsecas à espécie animal; como idade, estágio de desenvolvimento gonadal, sexo e predisposição genética; e condições ambientais.

O **Prochilodus scropha**, peixe utilizado neste estudo, foi uma das espécies animais seriamente atingidas por ocasião de ambos os descartes, o que destaca a relevância de sua utilização num bioensaio laboratorial controlado, envolvendo a exposição de peixes aos compostos fenoxiacéticos.

O herbicida fenoxiacético utilizado no presente estudo, é classificado comercialmente como de classe toxicológica II (Perigosos), identificados comercialmente pela tarja amarela. É um produto sistêmico de ação hormonal, de rápida translocação pelas raízes, e é aplicado com pulverizadores às lavouras recomendadas. O composto tem ação sistêmica sobre plantas de folhas largas (Dicotiledôneas), sendo recomendado portanto para lavouras de gramíneas e cereais.

As doses da mistura comercial recomendadas para o tratamento de culturas, provocam, nos vegetais sensíveis, má formação das folhas, desaparecimento da clorofila, paralização do crescimento e morte do vegetal.

Uma vez no solo, na água ou nos vegetais, ambos os compostos fenoxiacéticos da mistura comercial são passíveis de degradação química (FERRI, 1986), pela degradação da cadeia lateral e formação de resíduos clorofenoxiacéticos (2,4-diclorofenol e 2-metil, 4-clorofenol), seguida de hidroxilação nas seis posições do anel fenólico e posterior rompimento do anel. Quando no solo ou na água, sofrem ainda degradação microbiana (CHEN & ALEXANDER, 1989).

A recomendação do “WATER QUALITY CRITERIA” (1972) para a presença de 2,4-D em águas de uso público é de no máximo 0,02 mg/l.

Com a execução de bioensaios sob condições laboratoriais controladas e conhecidas, muitos aspectos morfológicos e metabólicos do quadro geral de intoxicação dos animais por pesticidas podem ser esclarecidos e corretamente relacionados, ou não, ao descarte poluente (HANSEN, 1984; MURTY, 1986; OVERSTREET, 1987).

A dificuldade em diferenciar a poluição como sendo a causa de uma doença ecológica, ou como um fator agravante naquele quadro, decorre basicamente do grande número de fatores abióticos e biológicos que interagem sobre o quadro clínico, e que podem inviabilizar a correta relação entre causa e efeito (SINDERMANN, 1979 e 1980).

O conceito geral, quando do uso de bioensaios, é o reconhecimento de que os primeiros efeitos dos contaminantes sobre os indivíduos presentes ao local afetado ocorrem a níveis subcelulares, quando são altamente específicos e algumas vezes reversíveis, (STEPHAN & MOUNT, 1973; PICKERING, 1981; FANTA, 1991).

A sequência de alterações funcionais pode, entretanto, desenvolver-se a níveis cada vez maiores da organização biológica do animal, podendo vir a afetar funções vitais, de maneira a comprometer a sobrevivência do indivíduo ou da população afetada (HAUX et al, 1988). Uma vez atingido este estágio, a substância contaminante poderá vir a exercer efeitos deletérios e irreversíveis àquele ecossistema (FRY, 1971).

Portanto, os efeitos de poluentes ambientais poder ser estudados em diferentes níveis da organização biológica geral, partindo dos níveis subcelulares aos populacionais (LITTLE, 1978).

Os ensaios laboratoriais envolvendo a exposição aguda de animais a diluições subletais de poluentes, são recomendados (STEPHAN & MOUNT, 1973; MURTY, 1986), porque conseguem detectar os primeiros efeitos dos poluentes sobre os organismos atingidos, ainda nos níveis celulares e subcelulares, em diluições que não resultem em morte, já que avaliam o organismo numa faixa de compatibilidade (VERNBERG & VERNBERG, 1970).

As análises mais recomendadas para o acompanhamento destes primeiros efeitos dos poluentes, tem no fígado o principal ponto de atenção (ROBERTS, 1978; PICKERING, 1981; FANTA, 1991) devido à sua posição metabólica nos organismos animais.

De um modo geral, o tecido hepático nos peixes organiza-se de modo menos cordonal que nos mamíferos, mas ainda assim são evidentes as trabéculas hepáticas (ROBERTS, 1978; HIBYTA, 1982). Nos animais analisados - em idade juvenil; este tecido mostrou uma organização celular uniforme, praticamente sem o arranjo cordonal típico dos animais adultos da mesma espécie.

A posição funcional do órgão, entre a circulação portal e a sistêmica coloca-o como importante centro de atividade metabólica, e o principal ponto de metabolização e excreção dos diferentes compostos removidos do sangue, através de reações específicas, como conjugação e oxidação. Logo, é o principal ponto de contato no corpo com drogas e compostos químicos que entram no organismo; e, junto com os rins constituem os locais que primeiro apresentam lesões advindos deste contato.

Entretanto, as principais lesões histológicas produzidas pelos poluentes químicos não são específicas, mas provocadas por um grande número de ingredientes ativos; e a inespecificidade destas lesões decorre do fato de envolverem, nas células lesadas, princípios comuns de resposta e compensação metabólica de base genética (VERNBERG & VERNBERG, 1970).

Uma das características elementares do protoplasma é sua habilidade de responder a estímulos ambientais, ativando mecanismos homeostáticos que procuram manter a célula numa posição fisiologicamente constante, frente a alterações externas, envolvendo conceitos de adaptação evolucionária com bases genéticas para ajustar o organismo ao ambiente que este ocupa (ALLEE et al, 1949).

A análise histopatológica dos animais expostos ao Bi-Hedonal confirma ser o parênquima hepático um importante alvo da ação tóxica dos fenoxiacetatos. MEYERS (1982) entretanto, ressalta que as principais lesões histopatológicas produzidas pelos fenoxiacetatos não são específicas para estes compostos, mas provocados também por inseticidas e herbicidas de outros grupos químicos.

As principais lesões histológicas nos animais estudados apareceram a 24 horas do início da exposição dos animais ao herbicida, e a maioria delas evoluíram a até 72 horas, quando ocorreu uma redução na intensidade dos sintomas.

Após 24 horas de exposição, os animais apresentaram uma evidente hipertrofia dos hepatócitos que intensificou-se após 72 horas do início da exposição, além do aparecimento de espaços intercelulares. MEYERS (1982) relaciona diversos pesquisadores que obtiveram hipertrofia celular em espécies diferentes de peixes, provocados por outros herbicidas e por um grande número de inseticidas organoclorados.

Da mesma forma, a presença no parênquima hepático, de grãos castanhos, evidentes nos animais após 48 horas do início da exposição, também já foram encontrados em tilápias expostas a inseticidas organofosforados (FANTA et al, 1988; FANTA et al, 1990).

Os quadros de congestão circulatória nos animais expostos após 48 horas do início da exposição e de vacuolização citoplasmática com lateralização nuclear, evidentes após 24 horas do início da exposição dos animais ao herbicida, são relatados por WALSH (1975), que encontrou estas mesmas lesões em salmonídeos expostos ao 2,4-D; ao DDT e ao Dieldrin, ao Malation, M-Paration e ao Carbaril.

Com respeito ao comprometimento mitocondrial hepático por drogas, SEGEL et al (1970) registrou o comprometimento respiratório do músculo cardíaco em ratos alcoolizados. ROBERTSON et al (1970) por sua vez, relatam os efeitos de ácidos fenoxiacéticos sobre a bioquímica celular de animais e vegetais expostos àqueles compostos, e menciona sua atuação sobre a respiração celular, sobre a fotossíntese e sobre a síntese de proteínas nas células vegetais.

As metodologias mais recentes de avaliação ecológica vem concentrando atenções no desenvolvimento de métodos bioquímicos, que possam servir como indicadores primários dos eventuais efeitos adversos de poluentes ambientais sobre o ecossistema afetado, ou até mesmo como base para a adoção de medidas de controle e sanidade dos ambientes envolvidos (HAUX et al, 1988).

Várias técnicas bioquímicas vem contribuindo para o acompanhamento de descartes de resíduos em ambientes aquáticos, além de fornecerem dados importantes a respeito da toxicidade dos diversos compostos envolvidos, e da bioquímica e fisiologia dos animais afetados.

A técnica manométrica de Warburg é útil na determinação de diferentes quocientes metabólicos; e, pelo método direto pode fornecer dados importantes a respeito das estruturas biológicas cuja atividade metabólica esteja sendo avaliada. Entre eles, está a determinação da velocidade de oxidação de substratos específicos e a determinação do consumo de oxigênio pelo material biológico testado.

Os quocientes metabólicos são obtidos com base no gás consumido durante o processo metabólico natural, em relação a uma unidade; a quantidade de tecido seco, capaz de traduzir a orientação do fenômeno analisado em números.

O quociente metabólico utilizado foi o QO_2 , ou Quociente Respiratório para O Oxigênio, obtido a partir da medida do consumo de oxigênio pelo material biológico analisado, em ul e a quantidade de proteína contida no sistema testado; e reflete instantaneamente qualquer comprometimento enzimático das estruturas celulares envolvidas no processo respiratório.

Os valores obtidos para o QO_2 , nos diferentes tempos de exposição (TABELA 3.1), quando comparados ao obtido pelo grupo controle, forneceram dados a respeito da inibição enzimática provocada pela exposição ao composto testado (FIGURA 3.3).

Com relação aos efeitos dos fenoxiacetatos sobre a respiração celular, ROBERTSON et al (1970) apontam o 2,4-D como sendo um agente desacoplador ou inibidor da oxidação de diversos substratos, deslocando a fosforilação oxidativa.

O sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial consiste de dois complexos multi-enzimáticos distintos, mas intimamente relacionados; a cadeia respiratória e a enzima ATPase/sintetase.

Em termos simplistas, a cadeia respiratória obtém equivalentes redutores a partir de vários substratos e suas respectivas desidrogenases. Os hidrogênios e elétrons são então transferidos para níveis menos energizados da cadeia respiratória, até reduzir o oxigênio em água.

A energia liberada por esta série de reações redox, é usada para dirigir a síntese de ATP a sítios específicos de conversão energética.

Nas mitocôndrias intactas, a oxidação está acoplada à síntese de ATP por complexos enzimáticos específicos, o que torna a medida de consumo de oxigênio pelos vários substratos e co-fatores um método analítico poderoso para estudar e quantificar o metabolismo mitocondrial.

A atividade mitocondrial do *P.scropha* foi seriamente comprometida, já após 2 horas de exposição à mistura fenoxiacética testada, comprovando a rápida penetração destas substâncias nos organismos animais. ERNE (1966) aponta o tempo de 2 horas após o início da exposição de galinhas (via oral) ao 2,4-D como sendo o pico de concentração plasmática em aves. O mesmo pesquisador sugere um tempo de 4 - 7 horas para que o 2,4-D atinja o pico de concentração plasmática em mamíferos.

A capacidade mitocondrial de oxidar o substrato adicionado (Succinato) ao sistema (SNELL et al, 1987) foi seriamente comprometida nos animais expostos ao herbicida, com inibições em torno de 90% da atividade a até 72 horas após o início da exposição. A partir do terceiro dia do início da exposição, os resultados obtidos para o QO_2 apontaram para uma recuperação metabólica importante do tecido analisado, com a redução da inibição da oxidação do Succinato pela suspensão mitocondrial para aproximadamente 30% em cinco dias após o início da exposição.

ERNE (1966) registrou o tempo de 72 horas para eliminação renal do 2,4-D em aves e mamíferos. Também nos peixes o tempo de eliminação dos fenoxiacetatos parece ser rápido, pois os resultados obtidos pelo presente estudo sugerem uma aparente recuperação metabólica do tecido hepático, apontada pelos dados respirométricos e pela avaliação morfológica, que também registrou, ao final de cinco dias do início da exposição, uma evidente redução da intensidade das lesões histológicas provocadas pelo herbicida testado.

5 CONCLUSÕES

1. **Prochilodus scropha** mostrou ser uma espécie viável para a utilização em bioensaios laboratoriais, envolvendo a exposição controlada de animais a pesticidas.
2. **P. scropha** mostrou-se suscetível à exposição a compostos fenoxiacéticos.
3. Diluições acima de 0,7 ml/l do herbicida hormonal fenoxiacético Bi-Hedonal (2,4-D + MCPA) mostraram-se letais para a espécie animal analisada.
4. A diluição de 0,1 ml/l do herbicida Bi-Hedonal mostrou ser o TLm para a espécie animal analisada, nas condições laboratoriais testadas.
5. O Tecido hepático provou ser metabolicamente afetado pela exposição dos animais ao herbicida testado.
6. As suspensões mitocondriais hepáticas preparadas a partir dos animais expostos ao herbicida foram seriamente comprometidas pela exposição, com inibições em torno de 90% de sua capacidade normal de oxidar o Succinato; ao menos até 72 horas após o início da exposição dos animais ao herbicida.

7. As lesões morfológicas apresentadas pelo tecido hepático iniciaram-se após 24 horas do início da exposição dos animais ao herbicida, e incluíram: hipertrofia celular; vacuolização citoplasmática; lateralização nuclear; formação e depósitos de grãos castanhos; congestão circulatória e espaços intercelulares evidentes.

8. Tanto o comprometimento mitocondrial como as lesões morfológicas apresentadas pelo tecido hepático apresentaram uma diminuição em intensidade ao final de 120 horas após o início da exposição por 24 horas dos animais ao herbicida testado, sugerindo uma recuperação metabólica e morfológica do fígado, sob as condições do bioensaio descrito.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEE, W. C. et al (1949). PRINCIPLES OF ANIMAL ECOLOGY. Saunders, Philadelphia, 78 p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION et al: "Bioassay Methods for the Evaluation of Acute Toxicity of Industrial Wastes and other Substances to Fish". In.: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 11 th ed. New York. 1960. 626 p. cap. 6. pp. 457-473.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION et al: "General Procedures". In.: "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". 11 th ed. New York. 1960. pp. 685-743.

ANDREWS, A. K. et al (1966). SOME EFFECTS OF HEPTACHLOR ON BLUEGILLS (*Lepomis macrochirus*). Trans. Am. Fish. Soc. 95:297.

BOTTIRILL, D. E. (1965). STUDIES ON THE UNCOUPLING ACTION OF 2,4-D. Diss. Abstr. 26:57.

BRANCO, S. M. (1971). HIDROBIOLOGIA APLICADA À ENGENHARIA SANITÁRIA. CETESB, São Paulo.

BRANCO, S. M. (1972). POLUIÇÃO. CETESB, São Paulo. 157 p.

BRODY, T. N. (1952). EFFECT OF CERTAIN PLANT GROWTH SUBSTANCES ON OXIDATIVE PHOSPHORILATION IN RAT LIVER MITOCHONDRIA. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80:533-536.

CARVALHO et al (1990). LEVANTAMENTO DA ICTIOFAUNA DA REPRESA DE JURUMIN (RIO PARANAPANEMA, SP). II: Aspectos da Diversidade, Abundância e Riqueza de Espécies. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Zoologia.* p. 271.

CHEN, S.; ALEXANDER, M. (1989). REASONS FOR THE ACCLIMATION FOR 2,4-D BIODEGRADATION IN LAKE WATER. *J. Environ. Qual.* 18:153-156.

COLLINS, T. F. X.; WILLIAMS, C. H. (1971). TERATOGENIC STUDIES WITH 2,4-D IN THE HAMSTER. *Bull. Environ. Contam. & Toxicology.* 6, 6:559-567.

COPE, O. B. et al (1970). SOME CHRONIC EFFECTS OF 2,4-D ON THE BLUEGILL (*Lepomis macrochirus*). *Trans. Am. Fish. Soc.* 99:1-12.

COUCH, J. A. (1975). HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF PESTICIDES AND RELATED CHEMICALS ON THE LIVERS OF FISHES. In.: RIBELIN, W.E. & MIGAKI, G. (eds.), *PATHOLOGY OF FISHES.* Wis. Press, Madison. pp. 559-584.

CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T. & BARR, W. T. (1985). *CELLULAR PATHOLOGY TECHNIQUE.* 4 ed. Butterworth & Co. Ltd. 642 p.

ERNE, K. (1966). DISTRIBUTION AND ELIMINATION OF CHLORINATED PHENOXYACETIC ACIDS IN ANIMALS. *Acta Vet. Scand.* 7:240-256.

FANTA, E. et al (1988). ESTUDO PRELIMINAR DO EFEITO DE UM ORGANOFOSFORADO EM *Tilapia rendalli* (PISCES, TELEOSTEI). VI Congresso Brasileiro de Biologia Celular. Brasília, DF.

FANTA, E. et al (1989). THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL OXYGEN AND CARBON DIOXYDE LEVELS ON THE TISSUE OXYGENATION AND BEHAVIOR OF ANTARTIC FISH. *Comp. Biocehm. Physiol.* 943 (4): 819-831.

FANTA, E. et al (1990). ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DO FOLIDOL-600 EM PEIXES DE ÁGUA DOCE. I Seminário Brasileiro de Agrotóxicos, Curitiba, PR.

FANTA, E. et al (1991). AÇÃO DE POLUENTES SOBRE TECIDOS. In.: SANTOS, H. S. L. (eds.), HISTOLOGIA DE PEIXES. FCAV-UNESP. 80 pp.

FERRI, M. G. (1986). FISILOGIA VEGETAL II. 2 ed. EPU/SP, 401 pp.

FREED, A. S. et al (1961). SOME PHYSICAL-CHEMICAL ASPECTS OF SYNTETIC AUXINS WITH RESPECT TO THEIR MODE OF THE ACTION. *Plant Growth Regulation. Proc. 4 th Int. Conf.* 289-303, Iowa State University Press, Iowa, U.S.A.

FRY, F. E. J. (1971). THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE PHYSIOLOGY OF FISHES. In.: FISH PHYSIOLOGY, Hoar W. S. & Randall D. J. (eds.) pp.1-98. Academic Press, NY.

GILL, T. S.; PANT, J. C. & PANT, J. (1988). GILL, LIVER AND KIDNEY LESIONS ASSOCIATED WITH EXPERIMENTAL EXPOSURE TO CARBARYL AND DIMETHOATE IN THE FISH *Puntius conchonius* Ham. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41:71-78.

HANSEN, D. J. (1984). UTILITY OF TOXICITY TESTS TO MEASURE EFFECTS OF SUBSTANCES ON MARINE ORGANISMS. In.: Concepts in Marine Pollution Measurements, edited by H. H. White, Maryland Sea Great College, College Park, pp. 33-56.

HARSHBARGER, J. C. (1986). HISTORICAL BACKGROUND AND REVIEW OF TUMORS IN FISH. 11 th Annual Fish Health Section/AFS; 11 th Annual Eastern Fish Health Workshop, U. S. Fish and Wild. Serv. Natl. Fish. Health Res. Lab., Kearnesville, West Virginia.

HAUX, C. et al (1988). BIOCHEMICAL METHODS FOR DETECTING EFFECTS OF CONTAMINANTS ON FISH. *Ambio* 17 (6):376-380.

HAWKINS, W. E. et al (1987). CARCINOGENICITY TESTS WITH SMALL FISH SPECIES. *Aquat. Toxicol.* 11; 00-00.

HENDRICKS, J. D. (1979). EFFECT OF VARIOUS HERBICIDES ON HISTOLOGY OF YEARDLING *Coho salmon*. In.: LORZ, H. W. et al (eds.) Effects of Selected Herbicides on smolting of *Coho salmon*, pp. 90-93. Corvallis Environmental Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, 600/3-79-071.

HINTON, D. E. et al (1973). USE OF HISTOLOGIC & HISTOCHEMICAL ASSESSMENT IN THE PROGNOSIS OF THE EFFECTS OF AQUATIC POLLUTANTS. *Biological Methods for the Assesment of Water Quality*, ASTM STP 528, American Society for Testing and Materials. pp. 194-208.

HIBIYA, T. (1982). AN ATLAS OF FISH HISTOLOGY, NORMAL AND PATHOLOGICAL FEATURES. College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon Univ. Tokyo - Japan. 147 p. Kodanska Ltd.

JOHNSON, D. W. (1968). PESTICIDES AND FISHES - A REVIEW OF SELECTED LITERATURE. *Trans. Am. Fish. Soc.* 97:358-424.

JÚLIO, H. F. et al (1990). ASPECTOS DA COMPOSIÇÃO DA ICTIOFAUNA DA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO RIO PARANÁ, NAS IMEDIAÇÕES DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO/PR. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Zoologia*, p. 273.

KING, S. F. (1962). SOME EFFECTS OF DDT ON THE GUPPY AND THE BROWN TROUT. *U. S. Fish. Wildl. Serv. Spec. Sci. Rep. Fish.* 399:22.

KUKOWICZ-RATAJCZAK, J. & KRECHNIAK, J. (1988). EFFECTS OF SODIUM 2,4-D ON RENAL FUNCTION IN THE RAT. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41:815-821.

LEHNINGER, A. L. (1976). *BIOQUÍMICA*. Vol. II. 2 ed. Edgard Blücher LTDA, São Paulo, pp. 265-384.

LITTLE, L. W. (1978). BIOASSAYS, PROCEDURES AND RESULTS. *Journal Water Pollution Control Federation*. Julho, 1978. pp. 1852-1868.

LOLITKAR, P. D. (1960). EFFECTS OF HERBICIDES ON THE OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIA FROM CABBAGE. *Diss. Abstr.* 21:446-447.

LOWRY, O. H. et al (1961). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *J. Biol. Chem.* 193:262-276.

MATHUR, D. S. (1962). STUDIES ON THE HISTOPATHOLOGICAL CHANGES INDUCED BY DDT IN LIVER, KIDNEY AND INTESTINE OF CERTAIN FISHES. *Experientia*. 18:506-509.

MEARNS, A. J. et al (1971). DISTRIBUTION OF NEOPLASMS AND OTHER DISEASES IN MARINE FISHES RELATIVE TO THE DISCHARGE OF WASTE WATER. *Annals New York Academy of Sciences*. pp. 210-224.

MEDeiros, M. L. M. B. et al (1984). POLUIÇÃO DAS ÁGUAS INTERNAS DO PARANÁ POR AGROTÓXICOS. Curitiba, SUREHMA. 37 p.

MEDINA, H. S. G. et al (1991). IMPACTO AMBIENTAL SOBRE ORGANISMOS AQUÁTICOS. Relatório FINEP-UFPR/SUREHMA. Curitiba, PR.

MERLIN, E. (1990). ESTUDO HISTOLÓGICO DO EFEITO DE CLOROFENOXIACETATOS EM PEIXES. I Simpósio sobre Ciências Médicas e Biológicas. Depto. Medicina Veterinária/UFPr. p. 20.

MEYER, B. et al (1983). INTRODUÇÃO À FISIOLOGIA VEGETAL. 2 ed. Fund. Calouste Gulbenkian, Lisboa. Cap. 18. pp. 467-504.

MEYERS, T. R. & HENDRICKS, J. D. (1982). A SUMMARY OF TISSUE LESIONS IN AQUATIC ANIMALS INDUCED BY CONTROLLED EXPOSURES TO ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS, CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS AND POTENTIAL CARCINOGENS. *Marine Fisheries Review*, 44 (12) : 1-17.

MEYERS, T. R. & HENDRICKS, J. D. (1985). HISTOPATHOLOGY. In.: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. G. M. Rand & S. R. Detrocelli, Hemisphere Publishing Co., New York, pp. 283-331.

MOLLER, H. (1985). A CRITICAL REVIEW ON THE ROLE OF POLLUTION AS A CAUSE OF FISH DISEASES. In.: Fish and Shellfish Pathology. A. E. Ellis, Academic Press, London. pp. 169-182.

MORELAND, D. E. (1967). MECHANISMS OF ACTION OF HERBICIDES. A. Rev. Pl. Physiol. 18:365-386.

MURTY, A. S. (1986). TOXICITY OF PESTICIDES TO FISH. CRM Press, Inc. 2 ed. 2:143 p.

OVERSTREET, R. M. (1988). AQUATIC POLLUTION PROBLEMS, SOUTHEASTERN U. S. COASTS; HISTOPATHOLOGICAL INDICATORS. Aquatic Toxicology, 11:213-239.

PATON, J. S. et al (1984). CAN TISSUE ANOMALIES THAT OCCUR IN MARINE FISH IMPLICATE SPECIFIC POLLUTANT CHEMICALS? In.: Concepts in Marine Pollution Measurements, edited by H. H. White, Maryland Sea Great College, College Park, pp. 511-538.

PESTICIDES MANUAL (1962). QUÍMICA DOS PESTICIDAS. 237-248 p.

PICKERING, A. D. (1981). STRESS AND FISH. Academic Press, London LTD. 267 p.

ROBERTS, R. J. (1978). FISH PATHOLOGY. Bailliére Tindall, London. 318 p.

ROBERTSON, M. M. et al (1970). THE MODE OF THE ACTION OF FOLLIAGE-APPLIED TRANSLOCATED HERBICIDES WITH PARTICULAR REFERENCE TO THE PHENOXYACETIC COMPOUNDS. Weid. Res. 10:94-120.

SEGEL, L. D. et al (1979). ACUTE EFFECTS OF ACETHALDEYDE AND ETHANOL ON RAT HEART MITOCHONDRIA. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm. 25 (3) : 461-474.

SINDERMANN, C.J. (1979). POLLUTION ASSOCIATED DISEASES AND ABNORMALITIES OF FISH AND SHELLFISH. A REVIEW. Fish.Bull 76:717-749.

SINDERMANN, C. J. (1980). THE USE OF PATHOLOGICAL EFFECTS OF POLLUTANTS IN MARINE ENVIRONMENTAL MONITORING PROGRAMS. Rapp. V Reun. Cons. Int. Expol. Mer. 179:129-134.

SUREHMA/PR (1984). LEVANTAMENTO TÉCNICO QUANTITATIVO E QUALITATIVO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DE AGROTÓXICOS UTILIZADOS E DAS PRINCIPAIS CULTURAS AGRÍCOLAS NAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DO PARANÁ, NO ANO DE 1984. Caderno Técnico SUREHMA No. 4. 87 p.

STEPHAN, C. E. & MOUNT, D. J. (1973). USE OF TOXICITY TESTS WITH FISH IN WATER POLLUTION CONTROL. In: *Biological Methods for the Assessment of Water Quality*. ASTM STP 528. American Soc. For Testing and Materials. pp. 164-177.

SPRAGUE, J. B. (1973). THE ABC'S OF POLLUTANT BIOASSAY USING FISH. *Biological Methods for the Assessment of Water Quality*, ASTM STP 528. American Soc. for Testing and Materials. pp. 6-30.

SCHÜTZ, M. T. B. et al (1990). ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS EM RATOS CONTAMINADOS PELO TORDON DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO. I Simpósio sobre Ciências Médicas e Biológicas. Depto. Medicina Veterinária, UFPr. p. 38.

STICH, H. F. (1976). FISH TUMORS AND SUBLETHAL EFFECTS OF POLLUTANTS. J. Fish. Res. Board. Can. 33:1993-2001.

TARARTUCH, A. L. et al (1990). PERFIL DA REATIVIDADE NEFROTÓXICA DO TORDON EM RATOS. I Simpósio sobre Ciências Médicas e Biológicas. Depto. Medicina Veterinária, UFPr. p. 40.

VEGA, S. G. (1985). EVALUACION EPIDEMIOLOGICA DE RIESGOS CAUSADOS POR AGENTES QUIMICOS AMBIENTALES. Centro Panamericano de Ecologia Humana Y Salud. OPS/OMS. 12 vol.

VERNBERG, F. J. & VERNBERG, W. B. (1970). THE ANIMAL AND THE ENVIRONMENT. Rinehart & Winston Inc, USA. 398 p.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. (1973). TÉCNICAS E EXPERIMENTOS EM BIOQUÍMICA. Guanabara Koogan, RJ. 552 p.

VILLELA, G. G. (1977). BIOQUÍMICA DA POLUIÇÃO. Ciência e Cultura/SBPC. 29 (5) 516-517.

WALSH, A. H. & RIBELIN, W. E. (1975). THE PATHOLOGY OF PESTICIDE POISONING. In.: W. E. Ribelin & Migaki, G. (eds), PATHOLOGY OF FISHES. pp. 315-557. Wis. Press, Madison.

WATER QUALITY CRITERIA (1972). BIOASSAYS. Section III - Freshwater Aquatic Life and Wildlife. Federal Water Pollution Control Administration, USDI Washington D.C.

WATER QUALITY CRITERIA (1972). GUIDELINES. Appendix II - Freshwater Aquatic Life and Wildlife. Federal Water Pollution Control Administration, USDI, Washington D.C.

WOLD, F. (1975). MACROMOLÉCULAS, ESTRUTURA E FUNÇÃO. Edgard Blücher, São Paulo. 249 p.