

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**MONOGRAFIA EM ZOOLOGIA**

**ANÁLISE BIOLÓGICA DE TRICLORFON UTILIZADO NO**  
**TRATAMENTO DE ENFERMIDADES DE**  
*Ctenopharingodon idella* **EM CULTIVO**

Monografia realizada no Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

**Aluna:** Ana Tereza Bittencourt Guimarães

**Orientador:** Prof. Walter Boeger, Ph.D

CURITIBA

1999

## ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Introdução .....	1
Metodologia .....	7
Resultados .....	10
<i>Crescimento</i> .....	11
<i>Histologia</i> .....	16
<i>Cromatografia</i> .....	20
Discussão.....	22
Literatura Citada .....	26

## AGRADECIMENTOS

Acho sinceramente que a parte dos “Agradecimentos” de uma monografia é a mais difícil de ser escrita. Escrever tecnicamente é muito mais fácil do que escrever emocionalmente, colocando em palavras a gratidão pela ajuda de muitas pessoas.

Bom, lá vou eu... tentar expressar emoção em palavras. Primeiramente, um eterno agradecimento ao meu orientador, Dr. Walter Boeger (Lê-se Bêguer), que foi quem me tirou de um poço de desilusão científica e tentou me mostrar a brincadeira da pesquisa, o gosto por estar sempre se questionando, fazendo-se sempre a pergunta por quê?, como?, quando?, onde?... Obrigado não apenas pela sua ajuda como orientador, mas também como amigo e, posso até dizer, como pai, fazendo-me sempre escolher as melhores rotas para navegar com o meu barco. Juntamente com o meu orientador, agradeço a sua família, Maria Regina e Bruno, que sempre me trataram com muita amizade e carinho.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Parasitologia do Pescado, Eloísa, Geraldo, Gislaine, Kerlen, Marcus, Popa, Rebeca, que sempre aturaram o meu mau-humor nas horas difíceis. A vocês, Gislaine e Kerlen, meu mais sincero obrigado, sem vocês a biometria teria sido muito mais difícil e muito menos divertida.

Agradeço especialmente a Prof. Rosana Rocha, coordenadora do curso de pós-graduação do curso de Zoologia, que me deu todo o apoio para eu realizar a minha pesquisa, principalmente, o apoio “logístico”. Em conjunto, agradeço a Tati, orientada da Prof. Rosana, quem sempre me deu tudo o que precisei, até as coisas mais esdrúxulas que alguém possa imaginar.

Obrigado ao CNPq e a FUNPAR pelo apoio logístico.

Agradeço a Prof<sup>ta</sup>. Edith Fanta que no início da minha graduação me propiciou um ambiente de trabalho e amizade com seu grupo, despertando-me para o que eu realmente gosto de fazer dentro da Ciência.

Às minhas queridas amigas do Laboratório de Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular, Ana Cristina (Big Little Boss), Ana Meyer, Flávia, Lucélia, Patê, Paula, Sandra, Sandaly, Silvinha, Soninha, que me ensinaram muito, muito mesmo! Valeu mesmo, meu muito obrigado! Patê, valeu os toques e o carinho nos momentos mais estressantes desta dissertação. Obrigado pelas broncas e pelos cinemas no meio do dia para relaxar. Como minha melhor amiga, você merece uma super nota DEZ, a POWER PATÊ!!!!

Soninha, minha querida professora e Mamy Willy, obrigada pelo primeiro empurrão dentro da Ciência. Serei eternamente grata a tudo o que me fez e pela alegria que você me dá a cada dia que te encontro. Sinceros agradecimentos antárticos!

Paulinha, Silvia e Lucélia, meu sincero super muito obrigado, o que vocês não me fizeram chorando quando eu lhes pedi rindo (risos, brincadeira!). Vocês realmente me fizeram enxergar, juntamente com a Patê, que as pessoas têm a vida que merecem, tenho certeza que vocês vão entender...

Agradeço ao querido Seu Nino, por todas as técnicas de histologia passadas a mim, pela paciência e dispêndio de seu próprio tempo para me ajudar. Ainda estou te devendo aquela tão esperada fita da Orquestra...

Falando da Orquestra, agradeço à minha doce amiga Norma, professora, conselheira, “psicóloga”, “manicure” e muitas outras profissões mais.

Agradeço a Rô, secretária do curso de Ciências Biológicas, por me quebrar todos os galhos, por me encaixar nos horários de outros cursos apenas para que uma mera ex-graduanda de Nutrição pudesse entrar em Biologia e realizar um sonho.

Agradeço ao Prof. Waldemar Tornisiello e Artur Bastos, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – USP/Piracicaba-SP, que me ensinaram todas as técnicas aqui utilizadas.

Obrigado ao Prof. Brás, do Departamento de Química, que me auxiliou nas análises químicas, parando o seu próprio trabalho para dar atenção a uma garota que lá chegou do nada, apenas com uma imensa vontade de aprender e trabalhar.

Meu super muito obrigado ao Prof. Marco Randi. Obrigado pela paciência que você teve de esperar este “filho” sair. Valeu!!!

Finalmente, agradeço à minha família, que por pouco não pedem para me mudar para a Universidade. Brincadeirinha!!! Vocês tiveram muita paciência e me ajudaram muito nos meus momentos de crise. Pai e Mãe, além do apoio, foram meus companheiros na batalha de fazer pesquisa neste país. Sei que em muitos momentos fui meio ausente, mas vocês me entenderam e permitiram a concretização dos meus ideais. João, mesmo você não entendendo a paixão pelo que eu faço, agradeço por você ser meu irmão e espero, sinceramente, que um dia você aceite o meu estilo e o meu jeito de ser. Paulo, obrigado pela sua ajuda na parte estatística deste trabalho. Não posso fazer nada se você é bom, as pessoas pedem o seu nome para ajudá-las. Lucinha, obrigado por trazer a felicidade do meu irmão. Natália, agora você não vai entender nada, mas quando você crescer um pouquinho, saberá o quão especial foi a sua vinda.

Ah! Agradeço ao Presidente Fernando Henrique por ajudar tanto a educação deste país. Era mesmo de se esperar, pois um homem que foi reitor de uma Universidade por

tantos anos só poderia estimular a pesquisa, o ensino e a extensão... Tentem! Esforcem-se! Olhem para dentro de seus laboratórios! Olhem para seus espaços e vejam o quão estimulados vocês estão sendo! Quem sabe um dia vocês consigam!

## INTRODUÇÃO

O começo da atividade da aquicultura no Brasil data do início do século XX. Porém, o seu maior crescimento se deu nestas três últimas décadas, provavelmente, como reflexo da diminuição da pesca extrativa e do aumento da demanda do pescado pelo mercado.

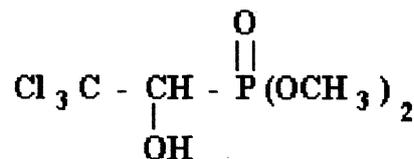
Mundialmente, o cultivo de organismos aquáticos é um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce. Na última década, a produção mundial de pescado proveniente da aquicultura tem aumentado numa proporção de 9,4%/ano (10,4 milhões t/ano em 1984 para 25,5 milhões t/ano, em 1994). De acordo com o IBAMA (1997) (ESTATÍSTICA DA PESCA NO BRASIL. CEPENE/IBAMA, nov/97 **apud** CEPTA, 1998), em 1996 a produção brasileira de pescado proveniente da aquicultura foi de 60.720 t., assim distribuída: Região Norte - 2.244 t; Região Nordeste – 9.036 t; Região Centro-Oeste – 11.794 t; Região Sudeste – 11.963 t; e, Região Sul - 25.683 t. Esta produção é responsável por 9% da produção brasileira total de pescado. Entretanto, não existem dados estatísticos representativos da potencialidade e evolução do setor no país (CEPTA, 1998).

Todavia, muito da produção nacional ainda é fortemente baseada no cultivo de espécies exóticas, o qual tem aumentado nos últimos anos. A introdução destas espécies não nativas acarreta, também, na importação de parasitos, os quais causam doenças antes não conhecidas em nosso território. Um exemplo de parasito causador de grandes perdas de cultivo é *Lernaea cyprinacea*, um crustáceo da ordem Copepoda. Este animal é extremamente prejudicial ao cultivo de peixes pois apresenta uma baixa especificidade parasitária, sendo já encontrado em peixes nativos como *Astyanax sp*, *Hoplias malabaricus*, *Corydoras paleatus*, dentre outros. Sua presença foi uma das principais causas das mortandade de peixes ocorridas no ano de 1995 no Estado de São Paulo (DIAS, 1996).

O cultivo e a comercialização de peixes ficam, também, prejudicados pela presença de agentes patogênicos. Segundo ROBERTS (1981), a diminuição do crescimento em peso e comprimento dos peixes é freqüentemente provocada por parasitos, sendo, portanto, um fator relevante para a atividade comercial.

Para o produtor, uma das formas de impedir o aparecimento de enfermidades é a utilização de produtos químicos como tratamento contra agentes patogênicos. Tais produtos podem ter diferentes tipos de ação, dependendo da estrutura química de cada princípio ativo. Alguns são capazes de eliminar parasitos com grande eficácia, sendo que as doses aplicadas com tal objetivo são tão reduzidas, que geralmente não afetam o hospedeiro (BROWN, 1993; DIAS, 1996; MACKINNON, 1997).

Os produtos mais utilizados, atualmente, em diversos países para tratamentos contra parasitoses são organofosforados. Existem diversos produtos para este fim, sendo que os mais usados têm como princípio ativo o Triclorfon. O procedimento mais comumente indicado na literatura pertinente é a aplicação semanal do Triclorfon numa concentração de 0,25 a 0,30 ppm, durante 4 a 5 semanas (BROWN, 1993, LAGUNA KOI PONDS, 1997; MITCHELL, 1998; ANÔNIMO, 1998). Esse produto (Triclorfon), nome químico 2, 2, 2 tricloro-1-hidroxietil-fosfonato (Fig. 1), é um dos diversos inseticidas organofosforados pertencente a classe dos fosfonatos. Um dos produtos comerciais que tem o Triclorfon como princípio ativo é o Dipterex 500, fabricado pela Bayer S.A do Brasil.



**Figura 1.** Fórmula estrutural de Triclorfon

O Triclorfon tem como características químicas: massa molecular de 257,5; estabilidade à temperatura ambiente e à luz; instabilidade acentuada sob condições de alta umidade, de forte acidez ou de basicidade. Como características físicas: sólido à temperatura ambiente; coloração branca; ponto de fusão de 83 -84 °C; solubilidade em solventes orgânicos e água à 25 °C em uma concentração de 154 g/L (CEPPA, 1988). É instável em altas temperatura e sofre reação de desidrocloração em meio alcalino e aquoso, formando um produto de maior toxicidade, denominado Diclorvos (DDVP) (MATSUNARA, 1985). Esta reação também ocorre em todos os grupos de animais. O Triclorfon tem ação sistêmica e é um excelente endo e ectoparasiticida.

O Diclorvos é um potente inibidor de colinesterases (ETO, 1974; HOFER, 1981 *apud* SALTE *et al.*, 1987). Este produto bloqueia a atividade colinérgica no gânglio central dos organismos alvos invertebrados. O Diclorvos inibe, também, a transmissão colinérgica no cérebro e músculos de peixes (WEISS, 1961 *apud* SALTE *et al.*, 1987) e vertebrados superiores. A cadeia metabólica deste produto está lustrada na Figura 2.

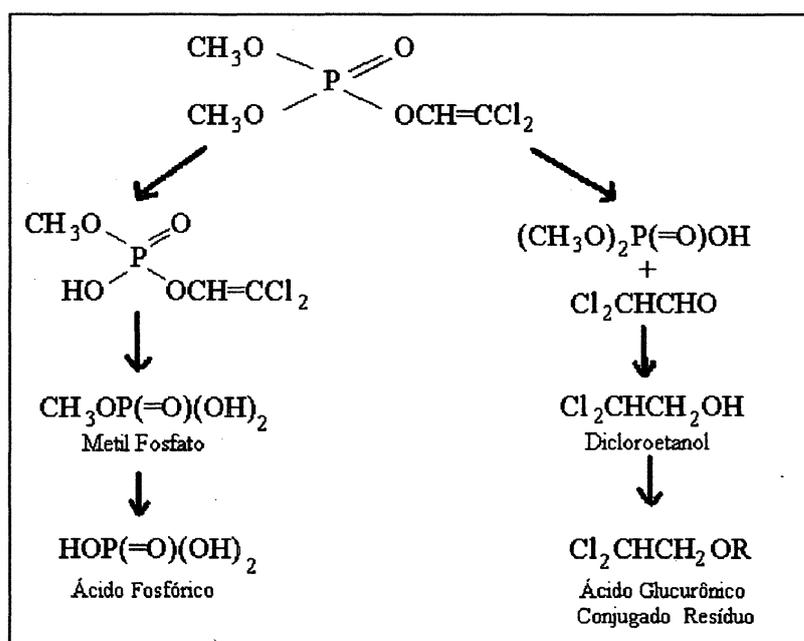


Figura 2. Cadeia metabólica do diclorvos (CREMLYN, 1978)

Mesmo sendo afirmado o contrário, organofosforados, como Triclorfon e Diclorvos, podem ter um efeito bioacumulativo, dependendo tão somente das características dos indivíduos expostos, como idade, nutrição e sexo (LARINI, 1979). Estudando modelos de ecossistemas, METCALF *et al.* (1974) observou a bioacumulação de produtos organofosforados em 335 vezes, em apenas 34 dias, em espécies de *Gambusia*. A bioacumulação destes produtos na musculatura e fígado dos peixes é um dos temas mais polêmicos entre os piscicultores, pesquisadores e órgãos governamentais. Geralmente, questiona-se sobre a permanência destes produtos na “carne” do peixe e quanto tempo após a aplicação os animais podem ser comercializados.

Os peixes podem acumular compostos químicos xenobióticos presentes na água ou no alimento, especialmente aqueles pouco hidrossolúveis. O produto, em solução ou em suspensão na água, penetra no organismo devido ao íntimo contato do animal com o meio. Os peixes extraem oxigênio do meio através do enorme volume de água que passa por suas brânquias, favorecendo assim, a absorção de químicos presentes na água (MURTY, 1986). O processo de entrada dos compostos, tanto através da água como pelo alimento, é influenciado por diversos fatores tais como a química da molécula, as condições físicas do meio e a fisiologia do próprio peixe tais como o conteúdo lipídico, o tamanho, o estágio de desenvolvimento e a atividade fisiológica em si.

Para eliminar tais produtos, o organismo os metaboliza e os transforma em compostos que podem ser excretados mais facilmente. Sendo assim, o fígado apresenta duas funções destacadas na biotransformação. A primeira é a transformação dos compostos lipossolúveis em derivados mais polares, facilitando a sua eliminação pelos rins. Estes compostos formados são mais hidrossolúveis do que as formas precursoras por conter mais radicais hidrofílicos ou por se apresentarem-se conjugados com agentes lipófilos. A segunda função do fígado é a

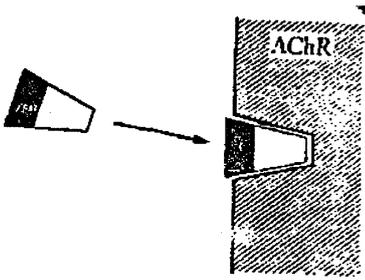
desintoxicação, sendo o produto químico convertido em uma forma que pode ser excretada, sendo perdida, portanto, a atividade do inseticida (LARINI, 1979).

Geralmente, o impacto destes produtos é maior nos organismos aquáticos do que nos terrestres, já que na água os pesticidas e outras substâncias são transportados a maiores distâncias. Portanto, um maior número de organismos “não-alvo” pode ter maior exposição no ambiente aquático do que no ambiente terrestre (MURTY, 1986). Sendo assim, estes produtos acabam também por causar patologias graves aos animais (eg. necroses, hiperplasias). Na piscicultura, por exemplo, o manejo inadequado dos viveiros e uma má aplicação destes produtos pode acarretar em uma possível contaminação do ecossistema.

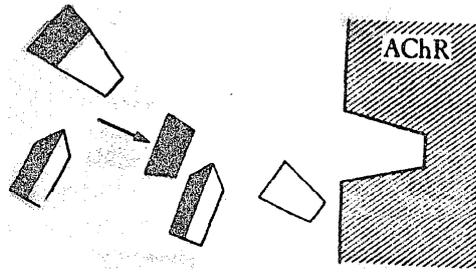
Em casos de contaminação, RICHMONDS & DUTTA (1989) afirmam que as brânquias dos peixes são os órgãos vitais do organismo que mais precocemente sofrem os efeitos de poluentes em geral. Substâncias tóxicas parecem causar uma diminuição na adesão entre as células do epitélio respiratório e as células pilares subjacentes, acompanhada por um colapso da integridade estrutural das lamelas secundárias (MACHADO, 1995). Devido a estes efeitos, as funções das brânquias podem ficar extremamente comprometidas.

Entre todas já comentadas, a principal consequência da ação dos produtos organofosforados é a inibição de colinesterases presentes no organismo, tanto no sangue (pseudocolinesterases) como nas terminação sinápticas (acetilcolinesterase) (SILVA, 1993). Fisiologicamente, a acetilcolina, sintetizada e liberada nas sinapses nervosas, vai interagir com os seus receptores produzindo respostas características (e.g. aumento do estímulo e tônus dos músculos esqueléticos, aumento do peristaltismo) (Fig. 3). As regiões ativas existentes na superfície da Acetilcolinesterase permitem uma interação enzima-substrato, proporcionando uma ação hidrolítica do centro esterásico, havendo, portanto, a transformação da acetilcolina, em colina e ácido acético (Fig. 4). Os inseticidas organofosforados inibem o centro esterásico

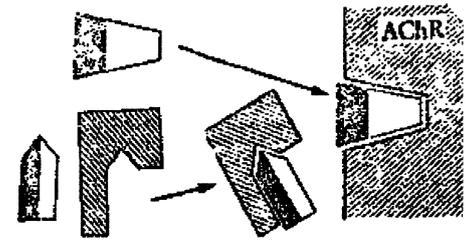
da Acetilcolinesterase, incapacitando a mesma de exercer sua função, ou seja, desdobrar a acetilcolina em colina e ácido acético (Fig. 5).



**Figura 3.** Ação fisiológica da Acetilcolinesterase - (▲) acetilcolina liberada na fenda sináptica, liga-se a receptores da membrana pós-sináptica, permitindo a continuação da transmissão do estímulo pelos axônios.



**Figura 4.** Função fisiológica da Acetilcolinesterase - (◻) acetilcolina faz a quebra da acetilcolina em colina (▲) e ácido acético (◻), sendo estes dois produtos novamente aproveitados pelo organismo.



**Figura 5.** Mecanismo da ação tóxica dos inseticidas organofosforados - os organofosforados (■) ligam-se a acetilcolinesterase, inibindo a sua atividade enzimática.

**Figuras 3 a 5 – Ação fisiológica da acetilcolinesterase e mecanismo de inibição por organofosforados (LARINI, 1979)**

Uma das espécies exóticas mais amplamente cultivada no país e que tem apresentado grandes índices de parasitismo é a Carpa-Capim, *Ctenopharyngodon idella*. Juntamente com a sua alta produção, tem crescido o número casos de infestações por espécies de ectoparasitos, em especial *Lernaea cyprinacea* e algumas espécies de Monogenoidea, como por exemplo, *Dactylogyrus lamellatus*.

Para a erradicação destes parasitos no Brasil, produtores fazem a aplicação de organofosforados como forma de tratamento. Porém, esta administração é feita de forma indiscriminada e sem uma metodologia devidamente avaliada. Atualmente, pouco se sabe sobre tempo de permanência e cinética deste tipo de produto no organismo. Esse desconhecimento e o descuido dos piscicultores na aplicação do produto acabam por causar graves prejuízos nas atividades econômicas e mesmo aos organismos cultivados e à saúde humana. Portanto, este trabalho visou avaliar, em condições controladas de laboratório, a

influência do uso de químico 2, 2, 2 triclora-1-hidroxietil-fosfonato (Triclorfon), nas dosagens recomendadas na literatura pertinente, sobre o crescimento de Carpas-capim, bem como danos histológicos e possível bioacumulação em seus tecidos após o período de tratamento.

## **METODOLOGIA**

O bioensaio foi idealizado para permitir a avaliação de efeito de Triclorfon sobre o crescimento em comprimento total e peso, a integridade tecidual de brânquias e fígado posterior ao tratamento e a bioacumulação na musculatura dos peixes. Para tal, dois experimentos com o mesmo arranjo experimental foram realizados. Dois aquários de 40 L foram montados, com dez exemplares de *C. idella* cada, provenientes da Piscicultura Pescobrás (Rodovia Alexandra/Matinhos). A filtragem da água, a oxigenação e a temperatura (25°C) permaneceram constantes, sendo os aquários mantidos sob capela de exaustão de gases. O fotoperíodo foi controlado em 12h00 luz/12h00 escuro. Os animais foram alimentados uma vez ao dia (total de 4 % da biomassa média calculada por aquário) com ração extrusada. A manutenção dos aquários foi realizada semanalmente, sendo sifonados os restos alimentares depositados no fundo e substituída 50 % do total da água substituída por água limpa. Os peixes foram aclimatados em seus respectivos aquários por um período de dez dias antes do início do experimento. Dipterex 500 (princípio ativo Triclorfon) foi adicionado à água do aquário tratamento numa concentração de 0,25 p.p.m., uma vez por semana, durante 5 semanas consecutivas, tendo sido obtida uma concentração final de 1,25 p.p.m, como recomendado por BROWN (1993) (LAGUNA KOI PONDS, 1997; MITCHELL, 1998; ANÔNIMO, 1998), para o controle de dactilogirose e de lerneose.

### ***Análise de crescimento***

Durante 15 semanas, foram registrados o peso (g) e o comprimento total (mm) de todos os peixes de cada aquário. As biometrias foram realizadas semanalmente, durante 5 semanas correspondentes ao período de tratamento. Após o tratamento, foram realizadas mais 4 medições a cada duas semanas. Os dados morfométricos foram posteriormente analisados no programa estatístico Statistica versão 5.1 (StatSoft, Inc.), sendo submetidos a análises de dados longitudinais (GUIMARÃES, 1994). Para realizar tais análises, foi feita a seleção de um modelo através do Critério de Informação de Akaike (AIC), sendo utilizados efeitos aleatórios para as duas variáveis. Os efeitos aleatórios (parâmetros) determinam a variação comportamental de cada indivíduo, submetido a situações diferentes (subpopulações), como controle e tratamento. Sendo assim, o modelo escolhido foi do tipo polinomial, encontrando-se ao final da aplicação funções de 2º grau para cada variável.

### ***Análise de bioacumulação***

Para detectar rastros do produto e o período de acumulação na musculatura dos peixes, foram coletadas três amostras com três peixes cada. A primeira amostra foi coletada após cinco dias da última aplicação do produto (33 dias do início do experimento); a segunda após dez dias (38 dias) e a última após vinte dias (48 dias). As três amostras passaram pelo processo de Soxhlet para a extração de produtos químicos (ANDREWS *et al.*, 1993; MAKAREWICZ *et al.*, 1993), tendo sido utilizado como solvente o diclorometano.

Após a extração do produto, a amostra foi evaporada em nitrogênio gasoso e posteriormente, solubilizada em metanol. A amostra foi, após a calibragem do cromatógrafo, injetada, tendo sido o tempo de análise de 20 minutos. O cromatógrafo era do tipo HPLC, o

qual apresentava uma coluna de sílica ODS de fase reversa. A fase móvel era composta por 15% de Acetonitrila e 85% de uma solução em pH 3,0 de ácido fosfórico 0,01 M dissolvido em água miliq (SAMUELSEN, 1987). O detector de UV acoplado ao cromatógrafo estava calibrado para um comprimento de 250 nm. O fluxo de solvente foi de aproximadamente 1 mL/min, a uma pressão próxima de 270 atm.

### ***Análise histológica***

Após o término do tratamento, três animais de cada aquário - controle e tratamento - foram submetidos à secção medular. Os 2<sup>os</sup> e 3<sup>os</sup> arcos branquiais e o fígado foram coletados de cada peixe e fixados em AFA (Álcool, Formol e Ácido Acético). Posteriormente, as amostras foram transferidas para álcool 70°. O material coletado foi submetido ao processamento de rotina, sendo desidratado em série alcoólica, diafanizado em xileno, com posterior impregnação e inclusão em Paraplast Plus®. Os blocos foram trimados e seccionados em micrótomo, sendo realizados cortes de 3 µm (STEDMAN, 1960). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina, para descrição da morfologia, e Alcian Blue pH 2,5, para evidenciar as células secretoras de glicosaminoglicanas ácidas carboxiladas e sulfatadas (CULLING *et al*, 1985). As lâminas permanentes foram selecionadas após a análise, sendo fotografadas com o auxílio do fotomicroscópio Olympus PM 10 AD, utilizando-se filmes Kodakcolor 35 mm, Iso 100.

Para comparação do número relativo de células de muco das brânquias nas duas situações, controle e tratamento, foram escolhidas, aleatoriamente, dez regiões das lamelas branquiais de cada indivíduo amostrado. Cada região foi digitalizada e analisada através do programa Image Tool for Windows, versão 1.28 (The University of Texas Health Science Center in San Antonio). O número de células de muco de animais controle e tratados foi comparado através de análise da variância (ANOVA).

## RESULTADOS

Durante a manutenção dos experimentos, pôde-se observar uma grande deposição de restos alimentares no fundo do aquário em tratamento. Mesmo depois do término da aplicação do produto e da posterior renovação total da água, o acúmulo de alimentos foi extremamente elevado quando comparado aos animais controle. Trinta por cento ( $n = 2$  no primeiro experimento e  $n = 4$  no segundo experimento) dos animais do aquário em tratamento apresentaram torção na coluna vertebral (Fig. 6). Em contraste, todos os peixes do aquário controle mostraram-se com sua morfologia normal durante todo o experimento.



**Figura 6.** Acima - Controle de *C. idella*. Abaixo - Lesão vertebral em *C. idella* tratado com Dipterex

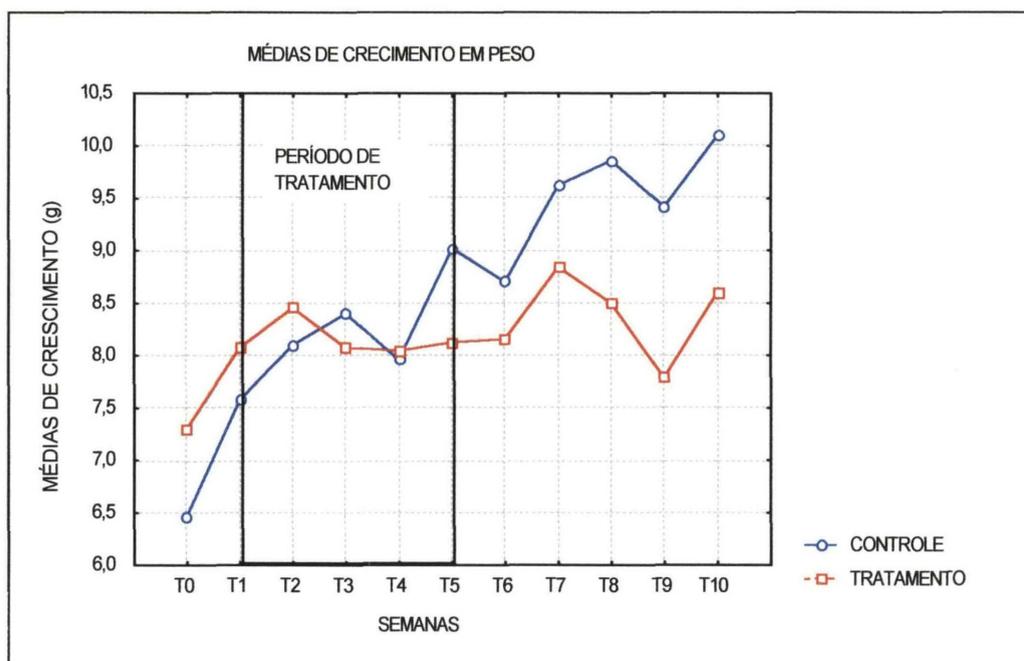
## Crescimento

As medidas de peso e comprimento total médios dos peixes no início do experimento estão apresentadas na Tabela I. Os animais controle apresentaram um crescimento em peso de 39,70%, enquanto que os de tratamento tiveram um percentual mais reduzido, equivalente a 11,83%. De forma semelhante, os peixes controle apresentaram um percentual médio de crescimento em comprimento de 2,95%, enquanto que os do tratamento não apresentaram um aumento significativo de tamanho (0%) durante o período de experimento.

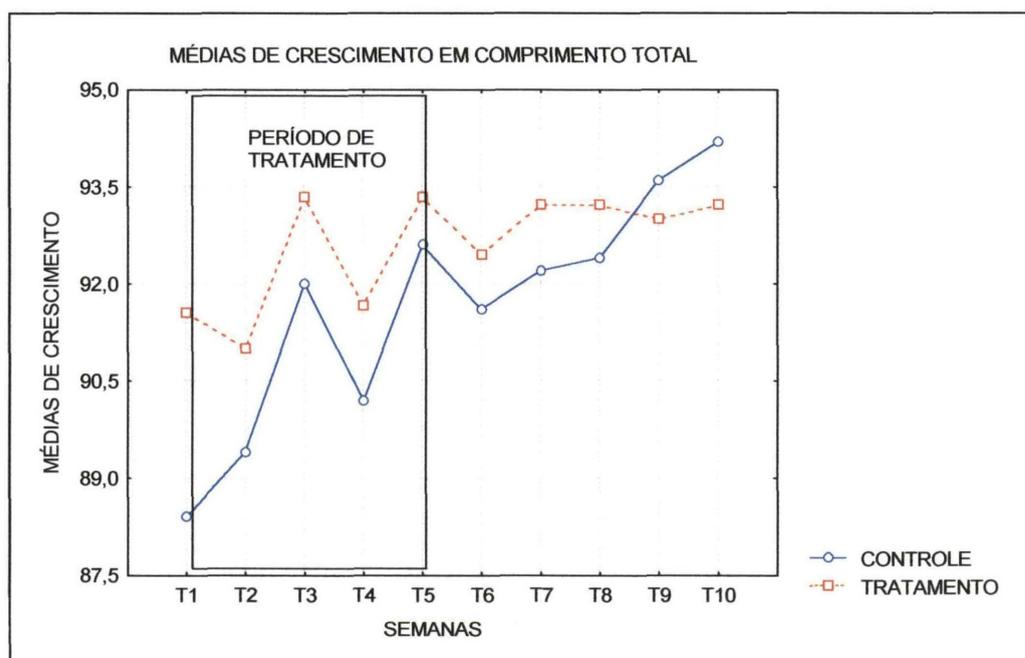
**Tabela I.** Médias de peso e comprimento total inicial e final e respectivos desvios padrões de *C. idella* utilizados no experimento.

	Etapa	Peso (g)	Desvio Padrão Peso (g)	Comprimento Total (mm)	Desvio Padrão Comp. Total (mm)
Controle	Inicial	7,230	1,326	91,500	5,852
	Final	10,100	2,204	94,200	3,370
Tratamento	Inicial	7,90	1,423	93,500	7,128
	Final	8,600	1,148	93,222	4,944

As curvas de aumento médio de peso e comprimento são relativamente semelhantes para os peixes de ambos os aquário (Fig. 7 e 8, respectivamente). A grande variação apresentada pelas curvas controle é provavelmente consequência da morte de um total de cinco indivíduos durante todo o período do experimento. Estes peixes encontravam-se dentre aqueles de maior valor em comprimento total e peso e, portanto, sua morte levou a uma queda drástica nas médias.



**Figura 7.** Curva de crescimento em peso dos peixes tratados e controles durante o período de 14 semanas. As primeiras cinco semanas, a partir de T1, são referentes ao período de tratamento (quadrado amarelo). As setas indicam as mortes de indivíduos durante o período experimental.

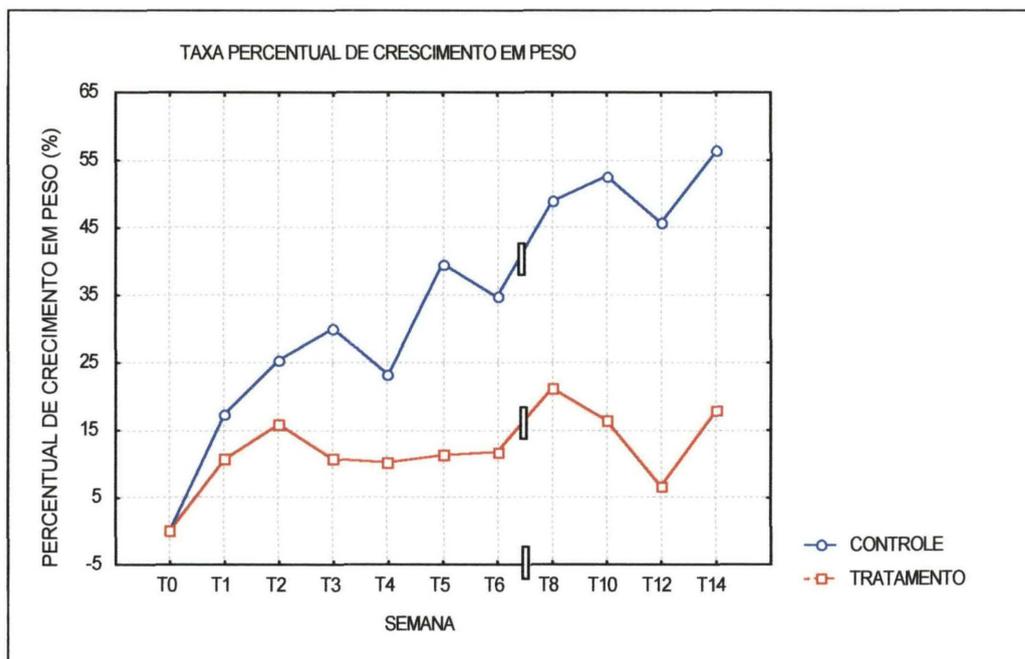


**Figura 8.** Curva de crescimento em comprimento total dos peixes tratados e controles durante o período de 14 semanas. As primeiras cinco semanas, a partir de T1, são referentes ao período de tratamento. As setas indicam morte de indivíduos durante o período experimental.

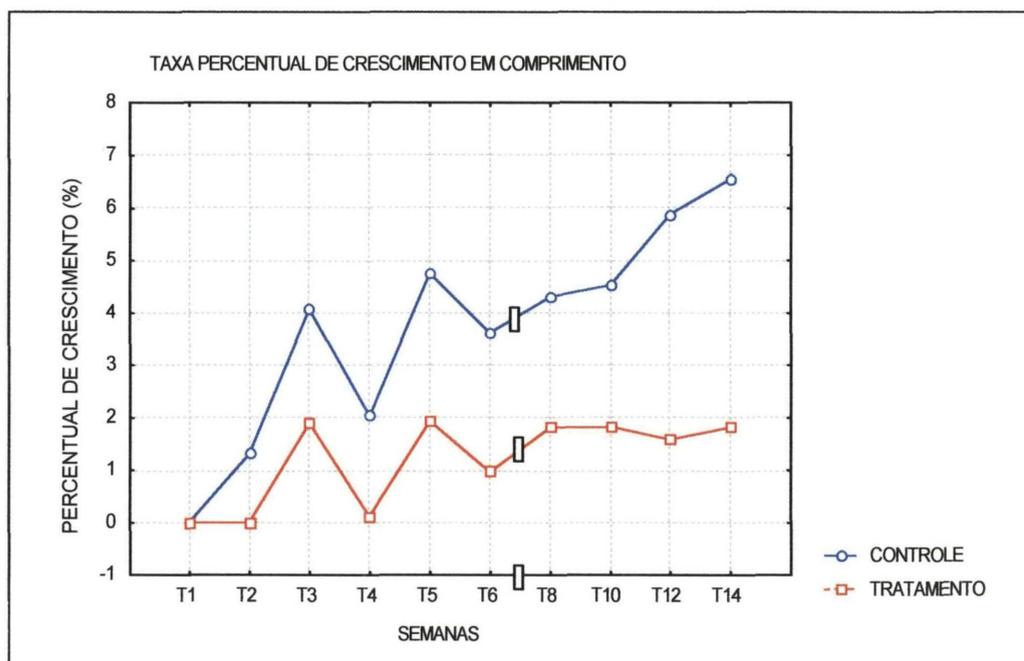
Mesmo não havendo uma diferença significativa na análise da variância das médias de peso e comprimento total ( $p < 0,05$ ), a análise das taxas percentuais de incremento semanal dessas duas variáveis sugere um maior crescimento dos peixes controle, quando comparados aos tratados. Em geral, as taxas relativas de crescimento semanal parecem sugerir que, durante e após o tratamento com Dipterex, ocorre uma redução das taxas de crescimento em comprimento total e peso em *C. idella*. Estas taxas de crescimento não voltam a níveis semelhantes àquelas dos peixes controle, durante o período analisado de 14 semanas. As taxas semanais de crescimento em peso e comprimento total tem um comportamento semelhante.

A taxa de crescimento em peso mantêm-se mais baixas nos peixes tratados durante o período de exposição ao Dipterex. Tendem a reduzir ainda mais, atingindo uma taxa de crescimento em peso nula na sétima semana após o término do tratamento, recuperando posteriormente (Fig. 9).

A taxa de comprimento total dos peixes tratados reduz logo no início do tratamento, permanecendo sem recuperação até o final do período analisado. Esta taxa atingiu o valor de 0 % (nenhum crescimento) após três semanas, subseqüentes ao tratamento de 5 semanas, permanecendo neste valor até o final do período analisado (9 semanas após o término da aplicação do produto) (Fig. 10).



**Figura 9.** Variação da taxa semanal de crescimento em peso dos peixes tratados e controles durante o período de 14 semanas. As primeiras cinco semanas, a partir de T1, são referentes ao período de tratamento (quadrado amarelo). As setas indicam morte de indivíduos durante o período experimental.



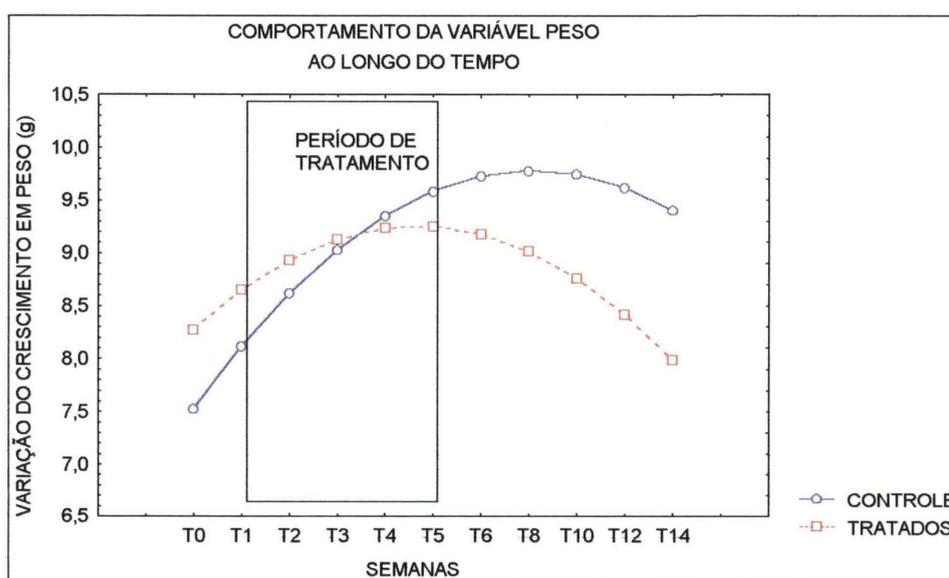
**Figura 10.** Curva da variação da taxa de crescimento em comprimento total dos peixes tratados e controles durante o período de 14 semanas. As primeiras cinco semanas, a partir de T1, são referentes ao período de tratamento (quadrado amarelo). As setas indicam morte de indivíduos durante o período experimental.

As análises longitudinais suportam algumas dessas observações. A análise da variável peso demonstrou uma diferença significativa no comportamento das duas subpopulações (controle e tratamento) ao longo do tempo, sendo elaboradas duas funções, uma para os peixes controle e uma para os tratados:

$$\text{Peso Médio Controle (g)} = 7,512 + 0,637 \times \text{dia} - 0,04483 \times (\text{dia})^2$$

$$\text{Peso Médio Tratado (g)} = 8,262 + 0,4201 \times \text{dia} - 0,04483 \times (\text{dia})^2$$

As equações acima resultam em curvas gráficas, que representam a tendência do comportamento da variável peso nas situações controle e tratamento ao longo do tempo. Inicialmente, pode-se observar que os peixes submetidos ao tratamento apresentavam médias superiores em relação à variável peso, como já foi discutido anteriormente. Porém, a tendência do crescimento dos peixes em situação de tratamento foi de decréscimo, principalmente após o término da aplicação do produto, enquanto que os controles mantêm seu crescimento durante todo o período estudado (Fig. 11).



**Figura 11.** Tendência do comportamento da variável peso ao longo do tempo em animais controle e tratados conforme função definida pela análise temporal.

A análise da variável comprimento total demonstrou não haver diferença significativa entre o comportamento das variáveis em ambas as situações. A equação definida para ambos os aquários foi (Fig. 12)

$$\text{Controles e Tratados} = 91,37 + 1,216 \times \text{dia} - 0,1255 \times (\text{dia})^2$$

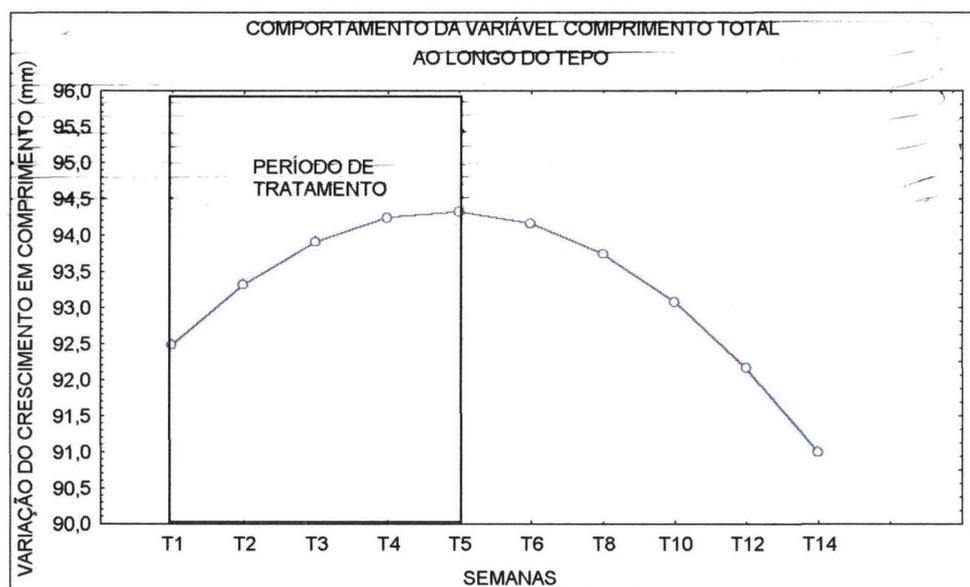


Figura 12. Comportamento da variável comprimento total ao longo do tempo nas duas situações, controle e tratado.

## Histologia

### Fígado

Imediatamente após o término do tratamento com Triclorfon (35 dias de experimento), alterações leves foram observadas em algumas amostras dos animais tratados. Os núcleos dos hepatócitos dos animais tratados (33,33% da amostra) mostram-se densamente corados com Hematoxilina de Harris (Fig. 13b). Porém, a maior parte das amostras de peixes tratados coletadas neste tempo mostraram os núcleos dos hepatócitos com aparência semelhante à dos animais controle (Fig. 13a e c).

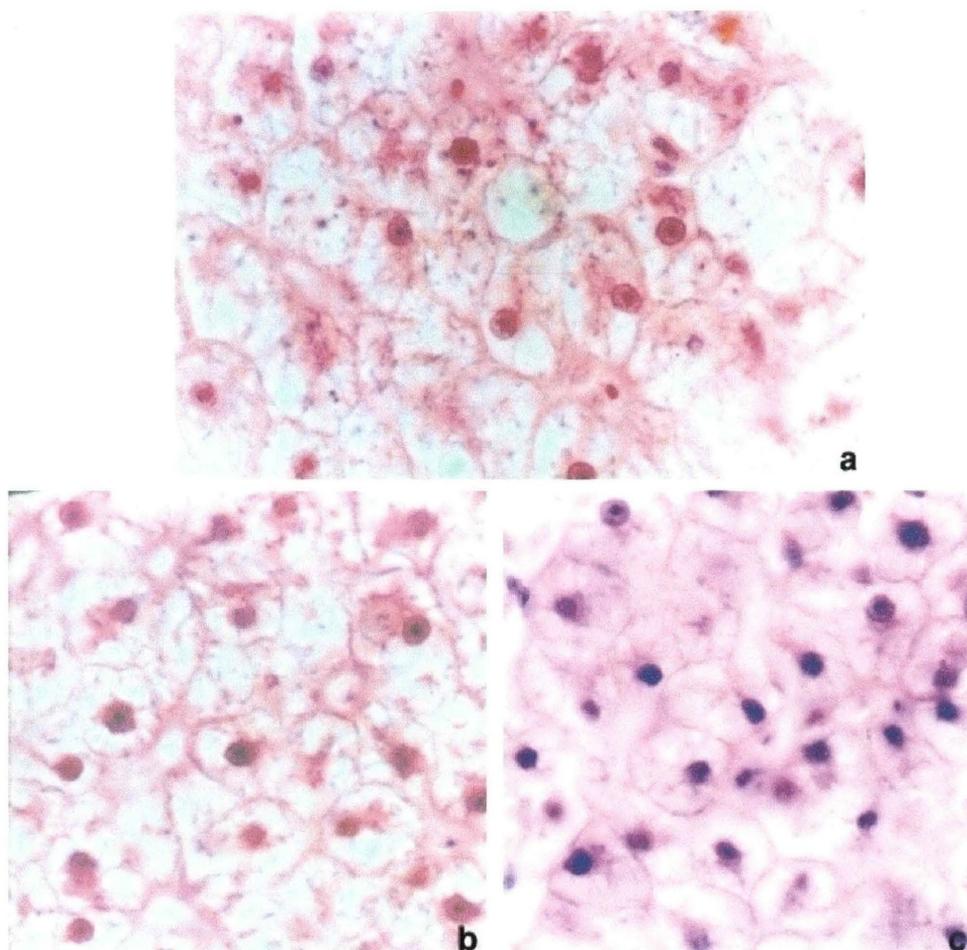
caso do núcleo (Fig. 13a). Porém, a maior parte das amostras de peixes tratados coletadas neste tempo mostraram os núcleos dos hepatócitos com aparência semelhante à dos animais controle (Fig. 13b).

### ***Brânquias***

Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa no número de células de muco nas brânquias de peixes tratados ( $X= 5,85$  células por campo medido) e controle ( $X= 5,20$  células de muco por campo medido) (Tab. II) (Figs. 14c e 14d). Nenhuma evidência de alteração histológica pode ser identificada nos animais expostos ao tratamento por Dipterex (compare Figs. 14a e 14 b).

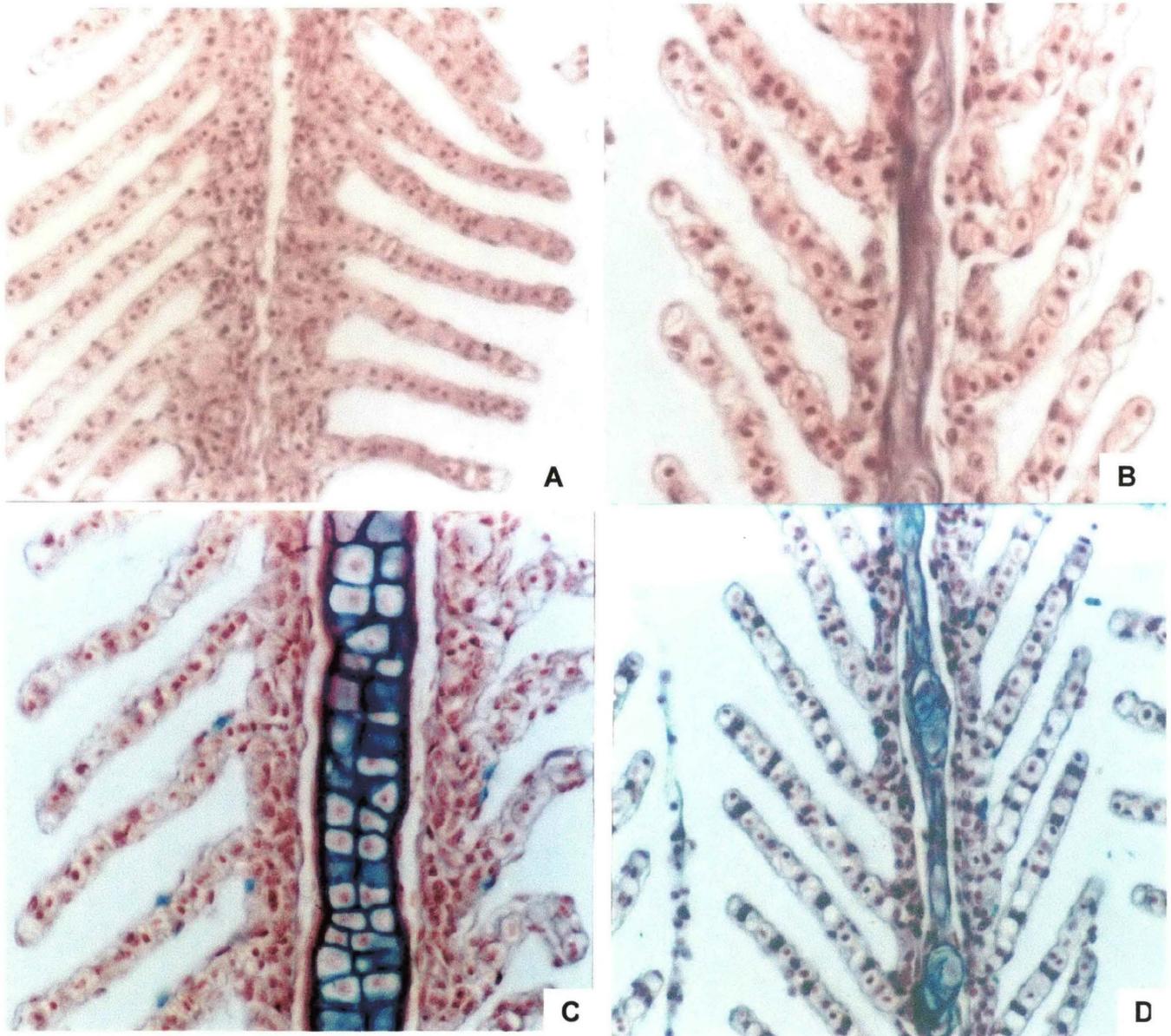
Tab. IV – Análise da variância sobre o número de células de muco em peixes controle e tratados.

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	1	4.225000	38	6.203948	.681018	.414387



#### LEGENDA

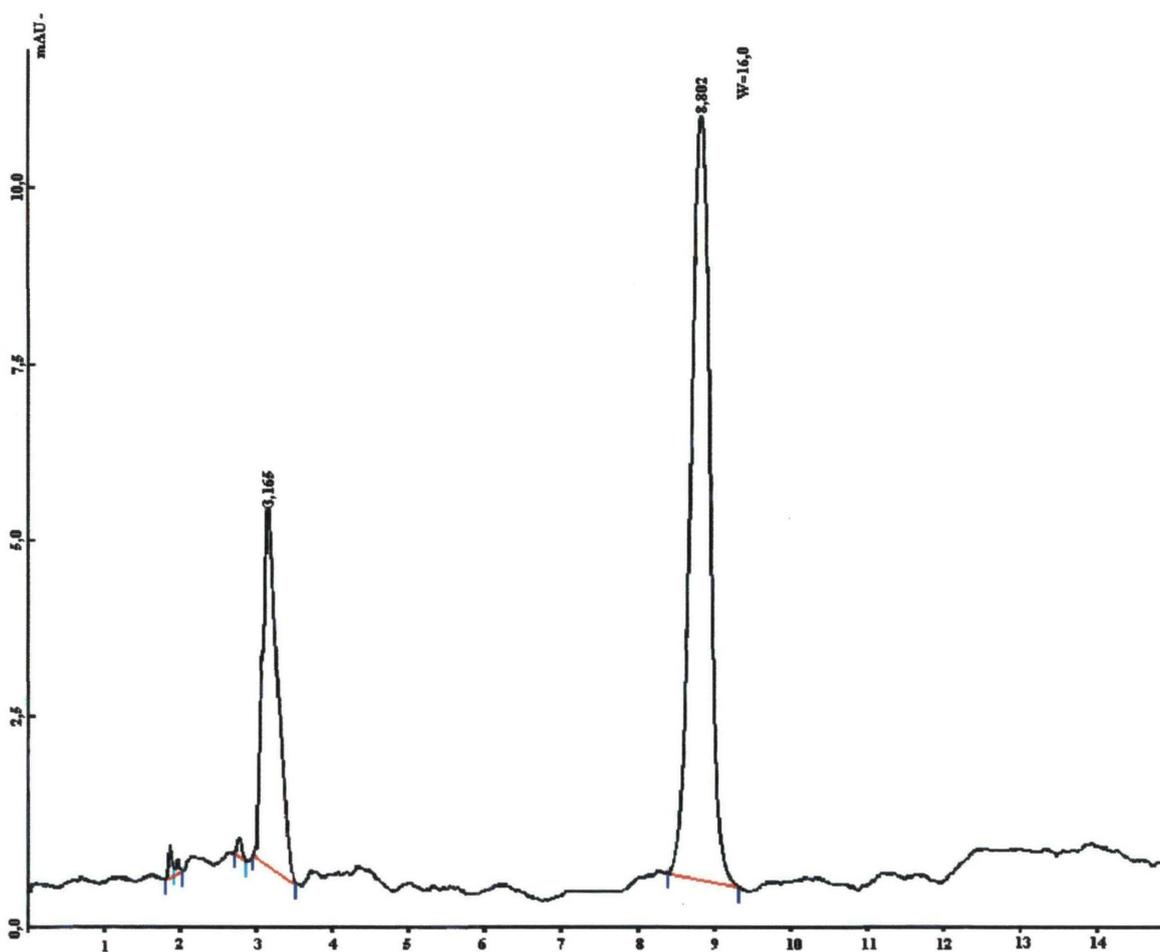
Figs. 13 a – c:- Fotomicrografia de fígado de *C. idella*. Coloração HE. Escala 10  $\mu$ m.  
Fig. 13 a – Animal controle; Fig. 13 b – Animal tratado com aparência normal; Fig. 13 c – Animal tratado apresentando núcleos picnóticos

**LEGENDA**

Figs. 14 a – d: Fotomicrografias de brânquias de *C. idella*, escala de 10  $\mu\text{m}$ ; Figs. 14 a,b – controle e tratado, respectivamente, corados em HE. Figs. 14 c, d – controle e tratado, respectivamente, corados em Alcian Blue pH 2,5.

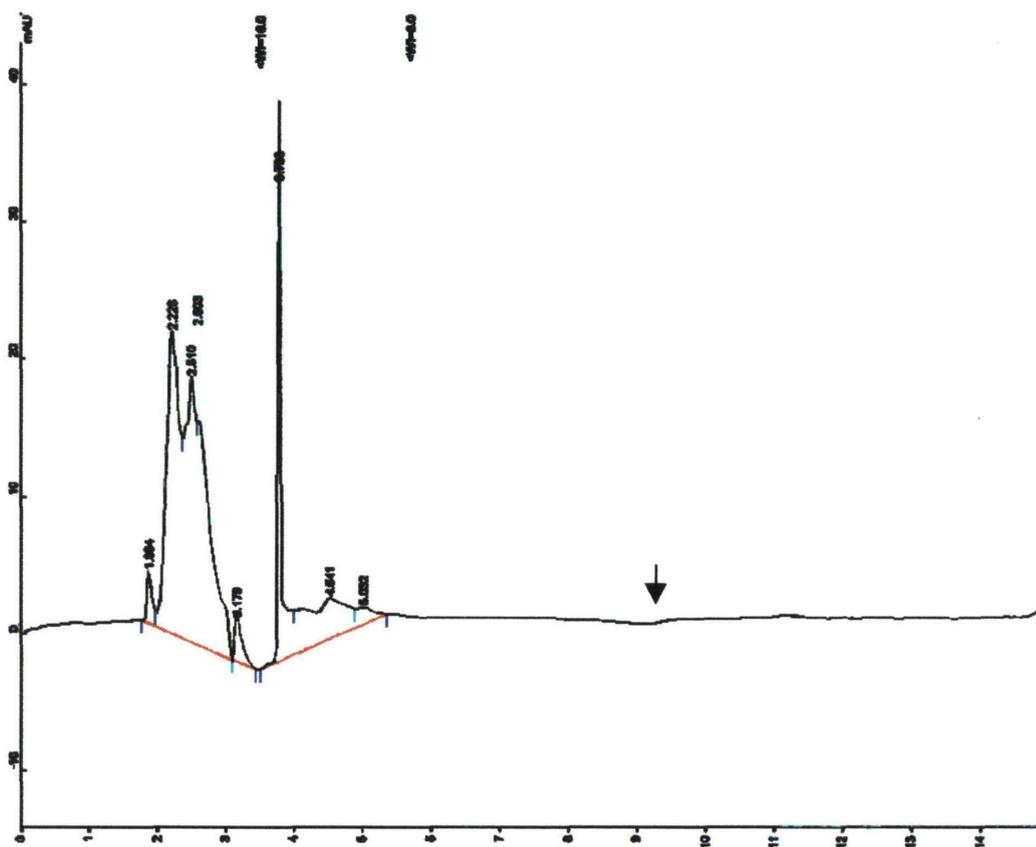
## Cromatografia

Uma solução aquosa padrão de Triclorfon (97,02%) a 50 ppm foi preparada, diluída em acetonitrila e aplicada no cromatógrafo. No cromatograma resultante (Fig. 15), pode-se observar dois picos: um representativo de acetonitrila no tempo de 3,165 (equivalente a 3,09 min); e outro, do Triclorfon em um tempo de retenção de 8,802 (equivalente a 8,48 min). Este padrão foi utilizado para posterior comparação com as demais amostras experimentais.



**Figura 15.** Cromatograma de fase líquida do padrão de Triclorfon. Tempo de retenção de acetonitrila = 3,09 min. Tempo de retenção 8,802 min

O cromatograma da amostra da musculatura de peixes coletados 5 dias (33 dias de experimento), após a última aplicação de 0,25 ppm de Trichlorfon (Fig. 16) mostra que não ocorre nenhum pico de retenção equivalente aquele representativo do Triclorfon padrão.



**Figura 19.** Cromatograma de fase líquida da amostra de 5 dias após a última aplicação de 0,25 ppm de Trichlorfon. Tempo de retenção de acetonitrila = 3,776 min. Tempo de retenção do metanol = 2,228 min.

( —▶ ) Tempo retenção equivalente ao do Triclorfon padrão

Esse cromatograma indica, portanto, que não existe evidência de bioacumulação de Triclorfon ou de seus resíduos de seus metabólicos na musculatura dos peixes tratados.

## DISCUSSÃO

Apesar do experimento não reproduzir as condições de cultivo, por ter sido desenvolvido em aquários e em ambiente onde todos os fatores abióticos estavam controlados, seus resultados alertam para possíveis problemas causados pelo uso do Triclorfon. Esses problemas, discutidos a seguir, devem ser considerados em projetos subsequentes e na tomada de decisões relacionadas ao uso de Triclorfon no tratamento de peixes cultivados.

Pode-se, de forma limitada, afirmar que o tratamento com Triclorfon (na metodologia e concentração testada) pouco altera as estruturas morfológicas dos órgãos vitais, e não é acumulativo na musculatura do peixe. Porém, inibe diretamente um dos fatores mais importantes do processo produtivo: a taxa de crescimento. A engorda de animais tratados é prejudicada, justamente pelos efeitos agudos e crônicos deste produto, promovendo, no mínimo, uma redução significativa do crescimento dos peixes tratados. O desenvolvimento de lesões da coluna vertebral é, claramente, prejudicial à comercialização.

Seja qual for a forma pela qual a aplicação de Dipterex aja negativamente sobre as taxas de crescimento em peso e comprimento total da Carpa-Capim, o efeito deletério parece permanecer mesmo após o término do tratamento. Nota-se que as taxas de crescimento dos peixes tratados, de maneira geral, não retornaram a níveis semelhantes àsquelas observadas para os peixes controle nas 14 semanas de experimento (Figs. 9 e 10).

Um dos primeiros efeitos agudos causados por organofosforados é a inibição do apetite (LARINI, 1979). Conseqüentemente, a falta da ingestão de alimentos, secundariamente causada pela inibição de colinesterases (ETO, 1974; HOFER, 1981 **apud** SALTE et col., 1987; WEISS, 1961 **apud** SALTE *et al.*, 1987; LARINI, 1979), pode acarretar em diminuição no crescimento em peso do animal, como observado nos resultados apresentados. A comparação dos gráficos das Figuras 11 e 12, onde no primeiro ocorre duas curvas com

diferenças significativas, e, no segundo, ocorre uma única curva representativa para as duas situações, levando a crer que toda a energia armazenada pelos peixes tratados é utilizada para o crescimento em comprimento.

Segundo TACON (1992), as espécies de peixe reduzem o seu crescimento quando ocorre uma deficiência alimentar de aminoácidos essenciais (e.g. Triptofano), de lipídios, de sais minerais (e.g. magnésio, fósforo) e, principalmente, vitamina C. Lesões vertebrais, como as identificadas em 30% dos peixes tratados, são bastante freqüentes e, provavelmente, são causadas pela deficiência de vitamina C. Essa deficiência pode resultar na produção inadequada de hidroxiprolina, um componente essencial da matriz colágena, e onde o cálcio é depositado para formar os ossos. Havendo a deficiência vitamínica, os ossos ficam enfraquecidos, mesmo que a deposição do cálcio seja normal (MERLE and MAYER, 1975; HAMILTON *et al.* 1981 *apud* HILTON, 1990). Esta síndrome pode surgir devido à depleção oxidante-dependente da vitamina C, ou de uma dieta deficiente, esta última sendo ainda mais importante em peixes que não sintetizam vitamina C.

Existe, porém, outra possível causa para lesões vertebrais observadas. Segundo HINTON (1990), deformidades esqueléticas já foram observadas em peixes selvagens sujeitos a dietas deficientes e expostos a pesticidas e metais pesados. Os organofosforados podem causar a torção do corpo devido a uma hiper contração da musculatura (JONHSON, 1994) (Fig. 6)

Analisando as secções histológicas de fígado de algumas amostras de animais tratados, pode-se observar núcleos picnóticos nas células hepáticas. Segundo HINTON (1990), a toxicidez de pesticidas organofosforados pode provocar a morte celular dos hepatócitos (apoptose), iniciando este processo a partir do condensamento excessivo da cromatina presente no núcleo (núcleos picnóticos). Desta forma inibe-se as diversas sínteses celulares, principalmente a síntese protéica, provocando, por final, a morte celular. Porém, a maioria das

amostras de fígado de animais tratados apresentavam um padrão semelhante ao do controle. Possivelmente, neste período de 35 dias já ocorre a recuperação ao efeito agudo do Triclorfon e de seus metabólitos, portanto, os hepatócitos se mostram com uma morfologia normal.

Em relação as brânquias, nenhuma diferença morfológica foi detectada. Segundo MALLAT (1991), a presença de uma substância estranha no meio, como p.e. organofosforados, pode fazer com que o organismo reaja liberando uma maior quantidade de muco, sendo este um mecanismo de defesa. Todavia, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o número de células de muco nas brânquias de animais controle e tratados com Triclorfon.

No cromatograma da amostra de musculatura de peixes tratados, coletados 5 dias após o último aplicação de Triclorfon (Fig. 19), não foi observado nenhum pico que evidenciasse a presença do produto e de seus metabólitos. Segundo MATSUNARA (1985), Triclorfon é um organofosforado bastante instável a altas temperatura e sofre rapidamente reação de desidrocloração quando está em processo de metabolização em organismos vivos. O produto desta reação apresenta uma maior toxicidade, sendo este denominado Diclorvos (DDVP). A meia vida de Diclorvos em pH 7,7, 13,5°C, é de 166 horas. Em menores temperaturas a taxa de degradação diminui. Isto leva a crer que a acumulação de Triclorfon e de seus metabólitos é muito baixa ou praticamente inexistente. Esse resultado corrobora com o trabalho de MACKINNON (1997), onde não foram detectados resíduos de Diclorvos em peixes mesmo após uma semana de contaminação.

Os resultados do presente trabalho, portanto, sugerem que os prejuízos causados pelo uso adequado do Triclorfon no controle de enfermidades em peixes são, aparentemente, indiretos, causados pela indução da perda de apetite. Danos histológicos foram reduzidos e a bioacumulação do composto e de seus metabólitos não foi detectada.

A sua aplicação, todavia, deverá considerar seu efeito crônico, de redução da taxa de crescimento e possíveis danos ao meio ambiente, flora e fauna do viveiro. Contudo, experimentos subsequentes devem avaliar esses parâmetros, sendo simulada uma situação de cultivo, para uma compreensão das consequências efetivas do uso de Triclorfon.

## LITERATURA CITADA

- ANDREWS, P.; NEWSOME, W.H.; BOYLE, M.; COLLINS, P. 1993. High resolution selective ion monitoring GC-MS determination of Toxaphene in Great Lakes fish. **Chemosphere**, 10, pp. 1865 – 1872.
- ANONIMO. 1998. Baths, dips and water treatments. Disponível na internet no endereço <http://www.geocities.com/Heartland/Ridge/9439/bath1.html>
- BROWN, L. 1993. **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Pergamon Press, Great Britain.
- CASTAGNOLLI, N. 1992. **Piscicultura de água doce**. UNESP.
- CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS. 1988. **Pesticidas: métodos de análise & informações técnicas, vol. 2**. Curitiba: Ed. UFPR.
- CREMLYN, R. 1978. **Pesticides, Preparation and Mode of Action**, Ed. John Wiley & Sons.
- CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. 1985 **Celular Pathology Technique**. 4 ed. Ed. Butterworth & Co. Ltd. p. 642.
- CEPTA. 1998. **Plano Básico para a Aqüicultura**.
- GUIMARÃES, P. 1994. **Modelo Linear Misto de Laird-Ware: Predição de Efeitos Aleatórios e Estimação de Parâmetros Via Filtro de Kalman**. Dissertação de mestrado em Estatística, UNICAMP.
- JOHNSON, E. 1994. Relevant Koi Diseases. Disponível na internet no endereço <http://www.koiusa.com/library/disease4.htm>

- HINTON, D. & LAURÉN, D. 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium** 8: 51-66.
- HUTSON, D.H. and ROBERTS, T.R. 1983. **Progress in pesticide biochemistry and toxicology**. Ed Page Bros, LTD.
- LAGUNA KOI PONDS. 1997. Parasitic crustaceans and monogenetic flukes. Disponível na internet no endereço <http://www.lagunakoi.com/html/medications.html>
- LARINI, L. 1979. **Toxicologia dos Inseticidas**. Ed. Savier, São Paulo.
- MACHADO, M. 1995. **Efeitos do Organofosforado Paration Metílico na morfologia e ultraestrutura branquial de pacu *Metynnis roosevelti* EIGENMANN, 1915 e suas implicações ecotoxicológicas**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, UFPR,.
- MACKINNON, B.M. 1997. Sea Lice: a review. **World aquaculture**, 28 (3).
- MAKAREWICZ, J.C; BUTTNER, J.K.; LEWIS, T.W. 1993. Uptake and retention of mirex by fish maintained on formulated and natural diets in Lake Ontario Waters. **The Progressive Fish-Culturist**, 55, pp. 163 – 168.
- MALLAT, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical revue, **Can. J. Fish Aquat. Sci.**, 42.
- MITCHELL, A.J. 1998. Parasite and Disease. Fourth Report to the fish farmers. Disponível na internet no endereço <http://www.tain.com/disease/parasite.htm>
- MURTY, A.S. 1986. **Toxicity of Pesticides to Fish**, Florida, USA: Ed. CRC Press, p. 117.
- RICHMONDS, C. & DUTTA, H.M. 1989. Histopathological Changes Induced by Malathion in the Gills of Bluegill *Lepomis macrochirus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 43, pp: 123-130.
- ROBERTS, R.J. 1981. **Patologia de los Peces**. Madrid: Mundi Prensa, 366 p,