

CÁCIA APARECIDA MENDES RUDNICKI

**ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS HISTOPATOLÓGIAS
CAUSADAS PELO ORGANOFOSFORADO AZODRIN® 400 SOBRE O
TECIDO BRANQUIAL DO PEIXE DE ÁGUA DOCE *Piaractus
mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) APÓS EXPOSIÇÃO SUBLETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dr.^a Edith Susana Elisabeth Fanta

CURITIBA
2004

Dedico este trabalho aos meus familiares,
especialmente ao meu esposo **Leandro** e a
minha mãe **Dalir**, que me apoiaram em cada
momento, ao meu pai **Ari** e ao meu irmão
Marcelo que estiveram juntos comigo,
mesmo estando longe.

AGRADECIMENTOS

A Deus que em sua infinita onisciência permitiu e sustentou esta etapa de minha vida.

A minha orientadora, Dr.^a Edith Fanta, pela orientação, amizade e incentivo.

À Dr.^a Lucélia Donatti pela ajuda no preparo do material de Microscopia Eletrônica de Transmissão e obtenção das imagens. Pela amizade, disponibilidade e por todas as contribuições feitas a este trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e a todos os seus professores integrantes, pela oportunidade de aperfeiçoamento e formação proporcionados.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Marlene B. De Camargo, por todo o auxílio prestado.

Jaime André Brum e Dércio (Projeto Pacu) pela doação dos juvenis de pacu.

Ao Departamento de Zoologia – UFPR pelo uso do fotomicroscópio Olympus BH-10AD e do programa Image-Pro Express[®].

Aos meus colegas do laboratório de Impacto Ambiental Gisele, Wagner, Pedro, Kleiton, Éster, Fabíola, Eloísa e Kátia.

Às amigas do curso de pós-graduação Gisele, Inês e Maritana pela atenção, amizade e carinho.

A Inês da Silva Rabbito pela amizade e por todo o auxílio prestado.

Ao Francisco Filipak Neto pela amizade e ajuda nos recursos de computação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, favorecendo o desenvolvimento este trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora constituída pelos professores: Dr.^a Edith Susana Elisabeth Fanta, Dr. Cláudio de Paula Soares Greca, Dr. Metry Bacila e Dr.^a Helena Gonçalves Kawall por toda a contribuição prestada através das correções e das sugestões feitas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1.INTRODUÇÃO	01
1.1.ORGANOFOSFORADOS	02
1.2.TOXICIDADE DOS ORGANOFOSFORADOS	03
1.3.TOXICIDADE DOS ORGANOFOSFORADOS EM PEIXES	04
1.4.ORGANOFOSFORADO AZODRIN® 400	05
1.5.CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE EXPERIMENTAL	07
1.6.CARACTERÍSTICAS DO TECIDO BRANQUIAL	09
2.OBJETIVOS	11
2.1.OBJETIVO GERAL	11
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3.MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1.BIOENSAIOS	12
3.1.1.Aclimação	12
3.1.2.Bioensaio para definição da faixa subletal	12
3.1.3.Bioensaio em nível subletal	15
3.2.COLETA DO MATERIAL	15
3.3.PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	15
3.3.1.Processamento para Microscopia de Luz	16
3.3.1.1.Análise das alterações histopatológicas em Microscopia de Luz.....	16
3.3.2.Processamento histológico para Microscopia Eletrônica de Transmissão	17
3.4.TRATAMENTO ESTATÍSTICO	18
4.RESULTADOS	19
4.1.FAIXA SUBLETAL DO ORGANOFOSFORADO AZODRIN® 400 PARA JUVENIS DE <i>Piaractus mesopotamicus</i>	19
4.2.TESTE DE TOXICIDADE EM NÍVEL SUBLETAL	20

4.2.1. Análise histológica das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> no grupo controle	20
4.2.2. Histologia branquial dos grupos experimentais	21
4.2.2.1. Tempo de exposição 1 hora	21
4.2.2.2. Tempo de exposição 4 horas	21
4.2.2.3. Tempo de exposição 12 horas	21
4.2.2.4. Tempo de exposição 24 horas	22
4.2.2.5. Tempo de exposição 48 horas	22
4.2.2.6. Tempo de exposição 72 horas	22
4.2.2.7. Tempo de exposição 96 horas	23
4.2.3. Tratamento estatístico	23
4.2.3.1. Descolamento mínimo	23
4.2.3.2. Descolamento brando	24
4.2.3.3. Descolamento moderado	24
4.2.3.4. Descolamento severo	24
4.2.3.5. Descolamento intenso	24
4.2.3.6. Hiperplasia, fusão e aneurisma	24
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	60
REFERENCIAS	61
ANEXOS	71

FIGURAS

	Página
Figura 1 Espécime juvenil de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	08
Figura 2 Esquema demonstrando as concentrações do organofosforado Azodrin® 400 e a distribuição dos indivíduos .	13
Figura 3 Arranjo experimental	14
Tabela 1 Número de peixes mortos em cada concentração testada durante o período de 0 a 96 horas	20
Figura 4 Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> do grupo controle	27
Figura 5 Organização ultraestrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> do grupo controle	28
Figura 6 Organização ultraestrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> do grupo controle	29
Figura 7 Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 1h	30
Figura 8 Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 4h	31
Figura 9 Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 4h	32
Figura 10 Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 12h e 24h	33
Figura 11 Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 24h	34
Figura 12 Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 24h	35

Figura 13	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 24h	36
Figura 14	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 48h	37
Figura 15	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 48h	38
Figura 16	Organização ultraestrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 48h	39
Figura 17	Organização ultraestrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 48h	40
Figura 18	Organização ultraestrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 48h	41
Figura 19	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 72h	42
Figura 20	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 72h	43
Figura 21	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 96h	44
Figura 22	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 96h	45
Figura 23	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 96h	46

Figura 24	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin [®] 400 – 96h	47
Figura 25	Organização estrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin [®] 400 – 96h	48
Figura 26	Organização ultraestrutural das brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto ao organofosforado Azodrin [®] 400 – 96h	49
Tabela 2	Quantificação das lesões branquiais em <i>Piaractus mesopotamicus</i> durante exposição aguda a 1,08 mg/L do organofosforado Azodrin [®] 400	50
Figura 27	Porcentagem da média de ocorrência de descolamento mínimo e de descolamento brando nas brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin [®] 400	51
Figura 28	Porcentagem da média de ocorrência de descolamento moderado e de descolamento severo nas brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin [®] 400	52
Figura 29	Porcentagem da média de ocorrência de descolamento intenso e de hiperplasia nas brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin [®] 400	53
Figura 30	Porcentagem da média de ocorrência de fusão e de aneurisma nas brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin [®] 400	54

RESUMO

Os impactos em ambientes aquáticos causados pela presença de pesticidas, dentre eles os organofosforados, podem provocar lesões em peixes. Assim, os efeitos do organofosforado Azodrin[®] 400 cujo princípio ativo é o monocrotofós, sobre as brânquias de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (pacu), foram investigados. Os peixes foram aclimatados às condições laboratoriais por uma semana. Para a determinação da faixa subletal do organofosforado Azodrin[®] 400, foram testadas as concentrações 6 mg/L, 3 mg/L, 1,5 mg/L e 0,75 mg/L. A faixa subletal obtida ficou entre 0,75 mg/L e 1,5 mg/L. Assim, a concentração utilizada para os testes em nível subletal foi 1,08 mg/L do organofosforado. Após a aclimação os peixes foram expostos, via hídrica, a 1,08 mg/L do organofosforado. Os tecidos foram coletados nos tempos 1h, 4h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h de exposição. Os peixes foram sacrificados após secção medular e a segunda brânquia direita foi fixada em Alfac e processada para microscopia de luz. Os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e as imagens foram capturadas em fotomicroscópio Olympus BX 51 acoplado a computador através do programa Image-Pro Express. Para o estudo ultraestrutural, amostras da segunda brânquia esquerda foram fixadas em Karnovsky e em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2, pós fixadas em tetróxido de ósmio 2%, pH 7,2, tratadas com acetato de uranila, desidratadas em série alcoólica crescente e emblocadas em resina (Poly/EMBED 812). Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 2% e Reynolds. Para o estudo ultraestrutural micrografias foram capturadas em microscópio eletrônico de transmissão e as patologias descritas e quantificadas foram: o descolamento epitelial, hiperplasia, fusão e aneurisma. O descolamento epitelial foi quantificado a partir de uma classificação estabelecida neste trabalho em mínimo, brando, moderado, severo e intenso. O descolamento foi encontrado em todos os tempos analisados, sendo mais intenso após 48 horas de exposição. Hiperplasia de células epiteliais foi mais freqüente após 24 horas de exposição. A fusão entre lamelas secundárias adjacentes foi predominante em 96 horas de exposição. O aneurisma foi mais freqüente após 12 horas de exposição. Estas histopatologias sugerem diminuição na eficiência das trocas gasosas com conseqüentes danos para a saúde dos juvenis de pacu.

ABSTRACT

The impacts caused by the presence of pesticides in aquatic environments, amongst them the organophosphorus (OP), can induce injuries in fish. Thus, the changes of the gills in juvenile *Piaractus mesopotamicus* (pacu), caused by sublethal level of the OP Azodrin[®] 400 (active principle monocrotophos) were investigated. The fish were acclimatized to laboratory conditions for one week. For the determination of the sublethal concentration of the organophosphorus Azodrin[®] 400, bioassays were done the concentrations 6 mg/L, 3 mg/L, 1.5 mg/L and 0.75 mg/L. The sublethal level lies between 0.75 mg/L and 1.5 mg/L. Thus, the concentration used for the tests at sublethal level was 1.08 mg/L of OP. After the acclimatization, the fish were exposed to 1.08 mg/L of the OP in water. Tissues were collected after 1h, 4h, 12h, 24h, 48h, 72h and 96h of exposure. Fish were sacrificed after medular section and the second right gill was fixed in Alfac and routine processed for light microscopy. Sections were stained in Hematoxylin and Eosin (HE) and the images were captured by means of an Olympus photomicroscope connected to a computer, through the Image-Pro Express program. For the ultrastructural study, samples of the second left gill were fixed in Karnovsky and 0.2 M cacodylate, pH 7.2, post-fixed in osmium tetroxyde 2%, pH 7.2, treated with uranyl acetate, dehydrated in graded series of ethanol, and embedded in Poly/EMBED 812 resin. The ultrafine sections (30-50 nm) were contrasted with uranyle acetate 2% and Reynolds. For the ultrastructural study, micrographs were captured from an electron microscope and the following pathological features described and quantified: epithelial detachment, hyperplasia, fusion of lamellae and aneurism. The epithelial detachment was quantified based on a classification established in this work, as minimal, soft, moderate, severe and intense. The detachment was found in all analyzed times, and higher intensity and intense detachment after 48 hours of exposure. The hyperplasia of epithelial cells was more frequent after 24 hours of exposure. The fusion between adjacent secondary lamellae was predominant after 96 hours of exposure. Aneurysms were more frequent after 12 hours of exposure. These histopathological suggest a reduction in the efficiency of the gaseous exchanges with consequent damages for the health of juvenil pacu.

1. INTRODUÇÃO

A cada dia o homem vem modificando o meio em que vive e o desenvolvimento de novas tecnologias possibilitou a ampliação de sua influência sobre a natureza. O homem utiliza o meio ambiente como fonte de matéria e de energia necessárias a sua vida ou como receptáculo de seus produtos e resíduos (MOTA, 1981). Nos últimos anos, a ação humana sobre a natureza tem se intensificado, gerando diversos tipos de impactos ambientais (BRANCO, 1998).

Os impactos ambientais agravam-se à medida que a população humana aumenta (BRANCO, 1998). Como conseqüência, aumenta a necessidade de uma crescente produção alimentar (RODRIGUES e FANTA, 1998) que leva a uma produção agrícola intensificada (BRANCO, 1998). Entretanto, a prática de uma agricultura intensiva requer, além do emprego adequado dos fertilizantes, uma proteção das plantas contra insetos, fungos, e ervas daninhas (FELLENBERG, 1980). Para este fim, são utilizados compostos químicos denominados agrotóxicos ou pesticidas (SANTOS, 1996).

Os pesticidas podem ser classificados em herbicidas, empregados no combate de ervas daninhas, em fungicidas, utilizados no controle de fungos patogênicos, em nematocidas, aplicados para matar nematódios parasitas e em inseticidas, usados no controle de insetos (MELLANBY, 1980).

O uso de pesticidas tornou-se parte integrante da agricultura moderna (CHEN e MULCHANDANI, 1998) sendo necessários para assegurar boas colheitas (SHAO-NAN e DE-FANG, 1996) garantindo um aumento da produção e da produtividade (WILSON e TISDELL, 2001). Por essas razões, são amplamente usados na agricultura mundial (KOH e JEYARATNAM, 1996; TSUDA *et al.*, 1990). Segundo WILSON e TISDELL, (2001) o consumo mundial de pesticidas tem chegado a 2,6 milhões de toneladas e deste total, 85% são utilizados na agricultura. No Brasil, o consumo ultrapassa 80 mil toneladas por ano (BRANCO, 1998).

Entretanto, o crescimento do uso de pesticidas vem causando sérios danos para o meio ambiente. Parte deste material incorpora-se às plantas e ao solo e grande parte é transportada para os rios pelas chuvas (BRANCO, 1998).

Os efeitos do uso de pesticidas constituem um problema reconhecido mundialmente e agravado pela utilização inadequada dos mesmos (PUGA e MELLO, 1982; SANTOS, 1996; TSUDA *et al.*, 1995; WILSON e TISDELL, 2001). O uso de pesticidas na agricultura pode causar problemas de intoxicação em trabalhadores rurais que manipulam e aplicam estes produtos de alta toxicidade. O risco do uso excessivo de agrotóxicos afeta, além de agricultores, os consumidores dos produtos agrícolas, animais domésticos, os alimentos, como frutos e vegetais, as fontes hídricas e o ecossistema como um todo (PUGA e MELLO, 1982; SANTOS, 1996; WILSON e TISDELL, 2001).

Os pesticidas empregados nas atividades agrícolas produzem efeitos diversos à saúde humana e ambiental. A contaminação resultante do uso de pesticidas para o homem e para os animais pode ser aguda ou crônica. No primeiro caso há uma exposição direta a uma única dose do produto, culminando com morte rápida ou lenta. Já no segundo caso, ocorre uma exposição constante a doses relativamente baixas, levando ao aparecimento de sinais ou sintomas relativos à intoxicação crônica (SANTOS, 1996).

1.1 ORGANOFOSFORADOS

Dentre os pesticidas destacam-se os compostos organofosforados, amplamente utilizados na agricultura mundial (SAMUEL e SASTRY, 1989; RODRIGUES e FANTA, 1998; SILVA *et al.*, 1993; PEHKONEN e ZHANG, 2002; SOGORB e VILANOVA, 2002). Os organofosforados são ésteres ou tióis derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (CAVERO, 1982; LU, 1996; SOGORB e VILANOVA, 2002). As propriedades inseticidas dos organofosforados foram evidenciadas a partir de 1937 por Gerhard Schrader, na Alemanha, com a síntese do Tabun e do Sarin, do OMPA (octametilpirofosforamida) em 1941, do TEPP (tetraetilpirofosfato) em 1943 e do Paration Etilico em 1944 (LARINI, 1999).

Atualmente, os pesticidas organofosforados têm sido amplamente usados em substituição aos compostos organoclorados nas atividades agrícolas (VARÓ *et al.*, 2000; PEHKONEN e ZHANG, 2002). Os compostos organoclorados são caracterizados pela persistência no meio ambiente e pela tendência de acumulação

na cadeia trófica (NEMR e ABD-ALLAH, 2004). Ao contrário, os organofosforados apresentam a vantagem de serem mais biodegradáveis e terem menos persistência no ambiente (BEGUM e VIJAYARAGHAVAN, 1995; VARÓ *et al.*, 2000; PEHKONEN e ZHANG, 2002; SOGORB e VILANOVA, 2002).

1.2 TOXICIDADE DOS ORGANOFOSFORADOS

Quanto aos efeitos toxicológicos, os organofosforados são considerados inibidores da enzima acetilcolinesterase (CAVERO, 1982; JOKANOVIC, 2001; DE SILVA e SAMAYAWARDHENA, 2002). Esta enzima é necessária para o controle normal da transmissão de impulsos nervosos de fibras nervosas para os músculos e células glandulares, e também para células nervosas em gânglios do sistema nervoso autônomo e no cérebro (CHEREMISINOFF & KING, 1994).

A acetilcolinesterase (AChE) possui a atividade enzimática de catalisar a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético. A acetilcolina permite a propagação bioquímica do potencial de ação entre os neurônios e entre esses e as placas motoras, sendo, logo após à transmissão do estímulo, degradada pela AChE (SAMPAIO e GUERRA, 1988). A inibição da AChE pelos compostos organofosforados é a principal causa das anormalidades relacionadas à transmissão neuromuscular, sendo os sinais e sintomas da intoxicação proporcionais ao nível de atividade da enzima. A interação entre a AChE e seu inibidor organofosforado parece envolver apenas o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável. Tal estabilidade está relacionada com a estrutura química do composto organofosforado (LARINI, 1999). Desta forma, a AChE é inibida, permitindo um acúmulo da acetilcolina nas junções neuromusculares, que produz intensa excitação e despolarização permanente dos músculos esqueléticos (SAMPAIO e GUERRA, 1988).

No homem, após a absorção, os compostos organofosforados concentram-se no organismo, especialmente no tecido adiposo, no fígado, nos rins, nas glândulas salivares, na tireóide, no pâncreas, nos pulmões, nas paredes do estômago e dos intestinos, no sistema nervoso central e nos músculos (LARINI, 1999). Alguns sinais e sintomas mais comumente observados nas intoxicações por organofosforados no homem são: distúrbios no sono, dificuldade de concentração, agitação, convulsões,

tremores, coma, náuseas, vômitos, dores de cabeça, dores abdominais, diarréia, diurese, transpiração excessiva, contração involuntária dos músculos (KOH e JEYARATNAM, 1996; LARINI, 1999).

1.3 TOXICIDADE DOS ORGANOFOSFORADOS EM PEIXES

A grande parte dos organofosforados são altamente não seletivos, e geralmente demonstram ser tóxicos para espécies não-alvo incluindo o homem e os demais seres vivos presentes no ambiente (OHKAWA *et al.*, 1980; BEGUM e VIJAYARAGHAVAN, 1995; HAGAR e FAHMY, 2002).

As áreas agrícolas tratadas com pesticidas, e entre eles os organofosforados, freqüentemente possuem corpos de água doce, tais como rios, lagos e reservatórios de água, os quais abrigam uma diversidade de fauna e de flora aquática (BEGUM e VIJAYARAGHAVAN, 1995). As constantes aplicações de organofosforados nas áreas agrícolas podem resultar em repetidas exposições dos organismos aquáticos a esses poluentes (BANAS e SPRAGUE, 1986).

Os pesticidas contaminam os sistemas aquáticos por ação do vento, do despejo direto de restos de soluções pesticidas, da lavagem dos recipientes e utensílios utilizados na aplicação, da contaminação do solo com os pesticidas aplicados nas plantas e da remoção dos pesticidas do solo por ação das águas pluviais e lixiviação ao meio aquático (FELLENBERG, 1980). Animais aquáticos podem assim, ser contaminados pela exposição hídrica aos pesticidas. Sabe-se que os peixes são particularmente sensíveis à contaminação com pesticidas (FELLENBERG, 1980; CEBRIÁN *et al.*, 1992). Segundo FANTA *et al.* (2003) muitos pesticidas permanecem em níveis subletais no meio ambiente aquático por períodos curtos ou longos e não são verificados porque não causam a morte imediata de peixes. Entretanto, mesmo em níveis subletais, os pesticidas organofosforados podem alterar significativamente vários processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos quando penetram nos órgãos dos peixes (SANCHO *et al.*, 1992).

Alterações fisiológicas foram observadas no estudo dos efeitos do Fenitrothion, um organofosforado, sobre o metabolismo energético do peixe *Anguilla anguilla*. Vários parâmetros tais como glicogênio, lactato, proteínas e níveis de glicose foram medidos em alguns tecidos após a exposição ao Fenitrothion. No fígado, o conteúdo

de glicogênio não mostrou alterações significativas, enquanto que os níveis de glicose aumentaram significativamente. Valores de lactato do fígado, brânquias e sangue aumentaram durante a exposição, enquanto que proteínas diminuíram em comparação ao controle (SANCHO *et al.*, 1997).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, pode ser citado o estudo envolvendo o peixe *Callichthys callichthys* exposto a níveis subletais do organofosforado Folidol® 600, em que a AChE teve sua atividade inibida em 90% após 4 horas, mantendo estes níveis de inibição por 96 horas (SILVA, 1989; SILVA *et al.*, 1993).

Os efeitos morfológicos resultantes da exposição de pesticidas organofosforados em peixes têm sido relatados por diversos autores. O estudo de RICHMONDS e DUTTA (1989) no tecido branquial do peixe *Lepomis macrochirus* após a exposição aguda ao organofosforado Malation, revelou a presença das alterações necrose das lamelas secundárias, edema, descolamento do epitélio e fusão de lamelas secundárias. Também nas brânquias do peixe *Oreochromis niloticus*, exposto ao Malation, foram observadas as alterações histopatológicas descolamento do epitélio, destruição da integridade de lamelas secundárias e fusão (CAPINPIN, 1994).

No fígado do peixe *Brachydanio rerio* o organofosforado Dimetoato causou desarranjo celular, núcleos picnóticos e necrose (RODRIGUES e FANTA, 1998). Também no tecido hepático de *Heteropneustes fossilis* após exposição aguda ao Malation, foi observado vacuolização, núcleos picnóticos e diminuição do diâmetro nuclear (DUTTA *et al.*, 1993). FANTA *et al.* (2003) observou no fígado de *Corydoras paleatus* contaminado com organofosforado Folidol® 600 necrose, núcleos picnóticos, vacuolização e lateralização nuclear.

No peixe *Lepomis macrochirus* a exposição ao organofosforado Diazinon revelou alterações no diâmetro dos canais seminíferos de espécimes machos (DUTTA e MEIJER, 2003) e retração citoplasmática em oócitos II e IV de espécimes fêmeas (DUTTA e MAXWELL, 2003).

1.4 ORGANOFOSFORADO AZODRIN® 400

O organofosforado escolhido para este estudo foi o Azodrin® 400, cujo princípio ativo é o monocrotofós (anexo IV). É um pesticida muito utilizado na

agricultura do Estado do Paraná sendo também, amplamente usado no controle de pestes agrícolas na Tailândia (THANGNIPON *et al.*, 1995) e na Índia (SANTHAKUMAR *et al.*, 1999; SALEHA BANU *et al.*, 2001).

O organofosforado Azodrin[®] 400 (fosfato de cis-(2-metilcarbomoil-1-metivinil)-dimetila) é um composto de alta toxicidade (CHEREMISINOFF e KING, 1994), produzido nos Estados Unidos pela Shell e apresentado como substância experimental em 1965 (MARICONI, 1980). O produto técnico apresenta dois isômeros. Um deles é biologicamente ativo, isto é, de valor inseticida e designado como isômero alfa. O nome químico monocrotofós refere-se apenas a este isômero, que está presente em aproximadamente 80% do produto técnico (SEAB, 2002). O isômero sem valor inseticida (configuração trans) está presente em cerca de 9% no produto técnico (MARICONI, 1980). O princípio ativo apresenta uma persistência curta no ambiente (SEAB, 2002).

O produto de grau técnico é de coloração marrom-amarelada e é solúvel em água, acetona (LARINI, 1999) e álcool (MARICONI, 1980). Pertence à classe toxicológica II, sendo considerado altamente tóxico para aves, abelhas e organismos aquáticos (CAVERO, 1982; GELMINI *et al.*, 1986; LARINI, 1999; RAMOS, 1999; SEAB, 2002). O Azodrin[®] 400 é utilizado no controle de insetos nas culturas de algodão, feijão, soja, milho, trigo, amendoim, café e batata (RAMOS, 1999; SEAB, 2002).

THANGNIPON *et al.* (1995) afirmam que o uso muito difundido do inseticida monocrotofós resulta em extensiva contaminação do meio aquático. As pulverizações aéreas, os derrames acidentais e as águas das chuvas são as principais formas de contaminação do meio aquático pelo monocrotofós. Deste modo, animais aquáticos são expostos ao inseticida em níveis que variam de agudo letal a subletal (THANGNIPON *et al.*, 1995).

Diversos estudos têm investigado a toxicidade do monocrotofós em peixes. No peixe *Channa punctatus* a exposição ao pesticida organofosforado monocrotofós produziu alterações fisiológicas significativas no metabolismo do animal sendo observado hipoglicemia e diminuição da concentração de glicogênio no fígado e no músculo (SAMUEL e SASTRY, 1989). A análise de parâmetros bioquímicos resultantes da exposição aguda de *Oreochromis niloticus* ao monocrotofós, revelou um progressivo declínio da atividade da AChE no cérebro do peixe (THANGNIPON *et al.*, 1995).

O estudo no tecido sanguíneo no peixe *Anabas testudineus* revelou que o monocrotofós produziu alterações na atividade eritropoiética e em outros parâmetros hematológicos (SANTAHAKUMAR *et al.*, 1999). No tecido hepático do peixe *Tilapia mossambica*, após exposição subletal ao organofosforado monocrotofós, foram observadas alterações como vacuolização, degeneração gordurosa e necrose (DESAI *et al.*, 1984).

1.5 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE EXPERIMENTAL

Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) é uma espécie nativa brasileira, de água doce, vulgarmente conhecida como pacu, caranha ou pacu caranha. Habita os rios tropicais e subtropicais da Bacia Paraná-Paraguai, sendo também encontrado em áreas inundadas do Pantanal Matogrossense (SEVERI *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 1998). É um peixe pelágico e sazonalmente migratório (SEVERI *et al.*, 1996).

O pacu é uma espécie de grande porte podendo atingir mais de 20 quilos, quando adulto. É um dos principais peixes utilizados nas pescas esportivas dos rios do Pantanal e da Bacia do Prata. Devido a sua facilidade de produção se tornou bastante popular nos pesque-pagues nas regiões sudeste e centro-oeste do país (PROJETO PACU, 2003).

Piaractus mesopotamicus pertence à ordem Characiforme, à família Characidae e à subfamília Serrasalminae (NELSON, 1994). Possui corpo de formato arredondado

lateralmente e de coloração marrom no dorso, gradualmente adquirindo um tom mais amarelado próximo à região ventral. Alimenta-se em seu ambiente natural de frutos, sementes, plantas, pequenos peixes, caramujos, entre outros (BRITSKI *et al.*, 1999; PROJETO PACU, 2003).



Figura 1 - Espécime juvenil de *Piaractus mesopotamicus* (Holmbeg, 1887).

A espécie estudada, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), apresentou-se como um excelente organismo experimental, adaptando-se facilmente às condições laboratoriais. A utilização de juvenis desta espécie facilitou o estabelecimento da relação gramas de peixe por litro de água, sendo possível a realização do bioensaio com um número maior de indivíduos expostos ao mesmo tempo. Um outro aspecto favorável é que o pacu é um peixe de hábito alimentar onívoro (PROJETO PACU, 2003), o que favorece a sua alimentação com ração durante os experimentos.

O peixe *P. mesopotamicus* pode ser encontrada em rios do Estado do Paraná (SEVERI *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 1998). Sabemos que as áreas agrícolas são comumente cortadas por cursos d' água ou estão muito próximas destes. Nestas condições, o ambiente aquático dulcícola sofre contaminações periódicas recebendo diferentes concentrações de um ou mais tipos de agrotóxicos. Os peixes nativos, como o pacu, podem assim, ser contaminados. Se, além disso, o agrotóxico afetar os juvenis, que ainda não tiveram a oportunidade de se reproduzir, o efeito sobre a população e sobre o ecossistema será ainda maior.

1.6 CARACTERÍSTICAS DO TECIDO BRANQUIAL

Como outros animais, os peixes precisam obter o oxigênio e eliminar o gás carbônico que resulta da respiração celular interna. As brânquias são o local típico onde ocorrem as trocas gasosas (PIIPER e SCHEID, 1982; LAURENT, 1982).

A estrutura geral das brânquias segue um padrão nos peixes teleósteos, havendo pequenas variações entre as espécies (RANDALL *et al.*, 2000). A estrutura branquial consiste de três componentes: os arcos branquiais, as lamelas primárias (ou filamentos) e as lamelas secundárias. Os arcos branquiais atuam como suporte das lamelas primárias, as quais sustentam as lamelas secundárias, e estas são os locais onde ocorrem as trocas gasosas (LAURENT, 1982).

A maioria dos teleósteos têm quatro pares de arcos branquiais ou brânquias situados dentro da cavidade faríngea (FERGUSON, 1995). Cada arco é suportado por um esqueleto ósseo e constituído por filamentos ou lamelas primárias. Em ambos os lados de cada lamela primária, estendem-se prolongamentos semicirculares denominados de lamelas respiratórias ou lamelas secundárias (FERGUSON, 1995). Basicamente, cada lamela secundária é composta de uma ou duas camadas de células epiteliais que são mantidas separadas por células pilares. Este epitélio é denominado de epitélio respiratório. As células pilares apresentam prolongamentos que delimitam os espaços sanguíneos, no interior dos quais o sangue flui. O tecido epitelial está sustentado por uma membrana basal que está em contato íntimo com as células pilares (FERGUSON, 1995).

A estrutura morfológica das brânquias está organizada de forma a aumentar, em muitas vezes, a área branquial em contato com o meio aquoso. Segundo FERGUSON (1995), as brânquias têm uma área superficial dez vezes maior do que o resto do corpo do peixe. Como visto, a área da superfície das lamelas primárias é aumentada pela formação das lamelas secundárias. Tal arranjo é eficiente para as trocas gasosas durante a passagem da água (ROBERTIS, 1981; STEWART, 1991).

O epitélio da lamela primária contém células de muco e células de cloreto. As células de muco são principalmente localizadas na margem da lamela primária, enquanto que as células de cloreto estão localizadas na base da lamela secundária (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995).

As brânquias realizam várias funções vitais para os peixes tais como trocas gasosas (JOHANSEN, 1982; DUTTA *et al.*, 1996; RANDALL *et al.*, 2000), excreção

e trocas iônicas (DUTTA *et al.*, 1996; HARTL *et al.*, 2000; RANDALL *et al.*, 2000), excreção de produtos metabólicos finais nitrogenados (GOLDSTEIN, 1982; JOHANSEN, 1982) e regulação ácido-base (GOSS *et al.*, 1994).

O epitélio branquial é a principal via para uma ampla ação de poluentes solúveis (STENTIFORD *et al.*, 2003). Os peixes são sensíveis a muitas classes de poluentes químicos dissolvidos na água, porque a superfície das brânquias está diretamente em contato com o meio ambiente externo e danos na sua estrutura podem interferir na respiração e na homeostase iônica (van den HEUVEL *et al.*, 2000). Portanto, a qualidade da água é um fator importante no sucesso do desenvolvimento e da reprodução de peixes. Onde a qualidade da água é alterada devido à presença de organofosforados ou outros poluentes, a estrutura histológica da vida aquática é adversamente afetada (DUTTA e MAXWELL, 2003).

As alterações histológicas constituem excelentes biomarcadores de exposição para tóxicos porque representam a integração bioquímica e fisiológica da injúria (HINTON e LAUREN, 1989). Assim, é essencial o estudo das alterações que podem ocorrer no tecido branquial após a exposição a organofosforados (DUTTA *et al.*, 1996; MACHADO e FANTA, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos do organofosforado Azodrin[®] 400 sobre as brânquias do peixe *Piaractus mesopotamicus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a faixa subletal do organofosforado Azodrin[®] 400 para juvenis de *Piaractus mesopotamicus*.
- Analisar qualitativamente e quantitativamente as alterações histológicas no tecido branquial de *P. mesopotamicus* causadas pela exposição subletal e aguda do organofosforado Azodrin[®] 400 através de avaliação em Microscopia de Luz e em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BIOENSAIOS

3.1.1 Aclimação

Para a realização dos bioensaios, foram utilizados juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Fig. 1) com comprimento total médio de 4,3 (\pm 0,6) cm e peso médio de 1,4 (\pm 0,6) g. Os peixes foram obtidos através de doação do Projeto Pacu – Fazenda Santa Rosa situada em Terenos – Mato Grosso do Sul. No laboratório de Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular, os juvenis de pacu foram divididos em 6 grupos e colocados em aquários com capacidade para 37 L para a aclimação. Os aquários tiveram as paredes posteriores e laterais revestidas por papel contact verde e a parte anterior protegida por anteparo verde. A cor verde é utilizada porque não interfere significativamente no comportamento e proporciona uma melhor adaptação dos peixes (FANTA, 1995).

Os fatores abióticos, durante a aclimação, foram monitorados e mantidos constantes sendo que o pH foi de 7,4 (\pm 0,25), a temperatura foi de 26,5 °C (\pm 1,0) a aeração foi constante e o fotoperíodo foi de 14 horas de luz e 10 horas de escuro controlado por timer. Os peixes foram alimentados com ração comercial e permaneceram em aclimação por uma semana.

3.1.2 Bioensaio para definição da faixa subletal

Para a determinação da faixa subletal do organofosforado Azodrin[®] 400 para juvenis de *P. mesopotamicus* foi utilizada como base a concentração de 6 mg/L, tendo como referência a concentração de 8 mg/L, devido a ser esta a maior concentração verificada na literatura (THANGNIPON *et al.*, 1995).

O bioensaio foi montado no Laboratório de Impacto Ambiental do Departamento de Biologia Celular. A exposição foi aguda (teve duração de 96 horas), por via hídrica, não havendo renovação do organofosforado teste (bioensaio estático). Foram testadas as concentrações de 0,75 mg/L, 1,5 mg/L, 3 mg/L e 6

mg/L, correspondendo a 25%, 50%, 75% e 100% da concentração de 6 mg/L, respectivamente. O volume total do Azodrin[®] 400 adicionado foi igual ao total de gramas de peixe contidas em cada aquário, respeitando a relação de 1g de peixe por litro de solução. Para cada concentração testada foram utilizados 20 juvenis (Fig. 2).

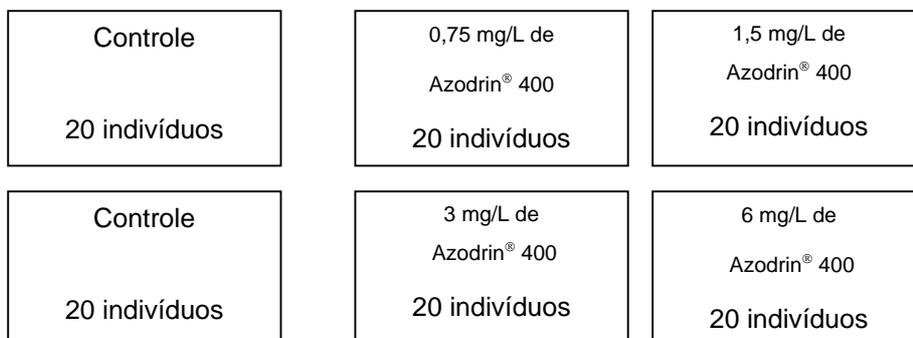


Figura 2 – Esquema demonstrando as concentrações do organofosforado Azodrin[®] 400 e a distribuição dos indivíduos.

A fim de evitar contaminação ambiental, os aquários contendo o organofosforado Azodrin[®] 400 foram acondicionados em capela de exaustão de gases (Fig. 3A – 3F), a qual permaneceu fechada durante o período de experimentação (Fig. 3F). Em cada concentração testada o organofosforado foi adicionado diretamente no aquário experimental (Fig. 3E) devido ao Azodrin[®] 400 ser solúvel em água (LARINI, 1999). A adição do organofosforado foi feita próxima ao aerador tendo em vista uma melhor distribuição no aquário. Durante os experimentos os peixes foram alimentados com ração comercial.

Durante os experimentos de definição da faixa subletal, os fatores abióticos foram monitorados e mantidos constantes tanto nos aquários experimentais como nos controles. O pH foi de 7,5 ($\pm 0,3$), a temperatura foi de 24°C ($\pm 2,0$) e o fotoperíodo foi de 14 horas de luz e 10 horas de escuro controlado por timer.

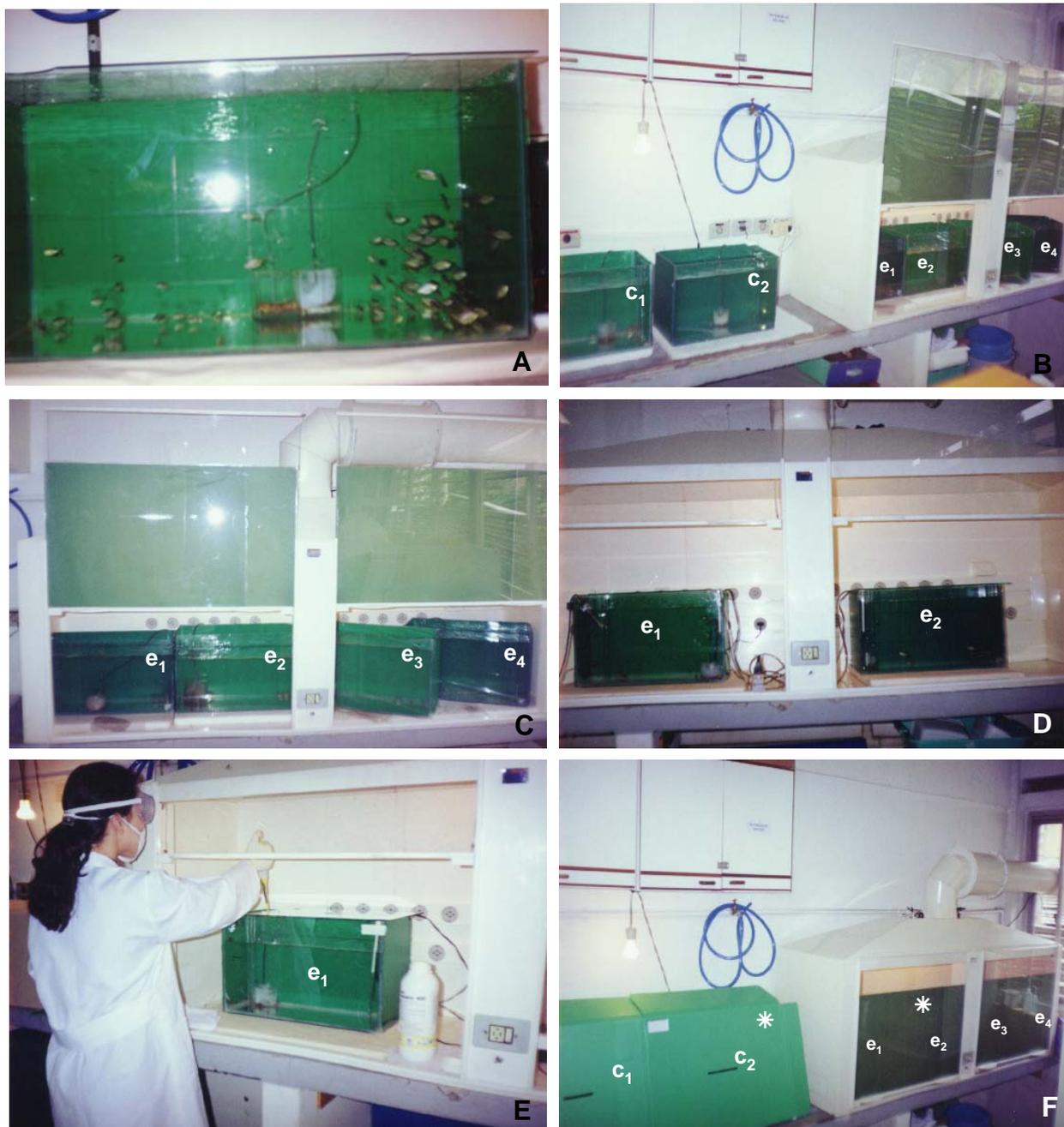


Figura 3 – Arranjo experimental. **A** – Aquário com juvenis de *Piaractus mesopotamicus*. **B** e **C** – Arranjo experimental para a determinação da CL_{50} . Aquários controles (**c**) e aquários experimentais (**e**) colocados no interior da capela de exaustão de gases. **D** – Arranjo experimental para bioensaio em nível subletal. Aquários experimentais (**e**). **E** – Gotejamento do organofosforado Azodrin® 400 em um aquário experimental. **F** – Aquários controles (**c**) e aquários experimentais (**e**). Anteparo utilizado em todos os aquários (*).

3.1.3 Bioensaio em nível subletal

O bioensaio em nível subletal foi realizado em aquários com capacidade para 37 L. Cada aquário foi contaminado com 1,08 mg/L do produto comercial, correspondendo a 0,0432 mg do princípio ativo, sendo o volume total do organofosforado adicionado igual ao total de gramas de peixe contidas em cada aquário e respeitando a relação de 1g de peixe por litro de solução. O total do produto comercial Azodrin[®] 400 foi pipetado e adicionado diretamente sobre o aerador em cada aquário experimental. A exposição foi aguda e por via hídrica. Foram utilizados 10 peixes para cada um dos seguintes tempos experimentais 1, 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

As condições abióticas foram monitoradas e mantidas constantes, sendo o pH 7,4 ($\pm 0,2$), a temperatura 26 °C ($\pm 1,0$) e o fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro controlado por timer e acompanhando o ciclo natural. Essas condições foram as mesmas para os aquários controle e experimentais. Durante o experimento os peixes foram alimentados com ração comercial.

3.2 COLETA DO MATERIAL

Após os tempos experimentais de 1, 4, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, os peixes foram sacrificados após secção medular. O segundo arco branquial direito e o segundo arco branquial esquerdo foram removidos de cada indivíduo.

A manipulação dos agentes contaminantes bem como dos animais contaminados, foi feita com utilização de luvas e máscaras (Fig. 3E). Os tecidos orgânicos não utilizados dos animais foram recolhidos, embalados, devidamente etiquetados e direcionados para a coleta de lixo tóxico da Universidade Federal do Paraná.

3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As brânquias de *P. mesopotamicus* foram estudadas através de técnicas histológicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, para o

estudo da morfologia branquial dos indivíduos controle e da morfologia branquial dos indivíduos contaminados com o organofosforado Azodrin[®] 400, em cada tempo de exposição.

3.3.1 Processamento para Microscopia de Luz

Para este estudo foi utilizado o segundo arco branquial direito. As brânquias foram fixadas em solução de Alfac (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por 16 horas. A fixação foi realizada em placas de Petri, banhados na solução fixadora, sob uma lamínula. Este procedimento teve como objetivo alinhar os filamentos branquiais, de forma a permitir um melhor direcionamento dos cortes histológicos (MACHADO, 1995). Após a fixação, foram efetuadas lavagens sucessivas em álcool 70% para a remoção do excesso do fixador. Em seguida, o material foi desidratado por uma série crescente de álcool (etanol) 80%, 90% e 100%, diafanizado em xilol, impregnado e incluído em Paraplast Plus (Sigma[®]), seguido de emblocagem com posterior trimagem.

A partir dos blocos trimados, foram feitos cortes com uma espessura de 5 µm. Os cortes foram distendidos em lâminas de vidro contendo uma camada fina de albumina a 1% e água destilada e secos à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para a realização da análise morfológica. A montagem das lâminas permanentes foi feita com resina Poly-Mount (Sigma[®]), seguida de secagem em temperatura ambiente.

As soluções fixadoras, os corantes, os roteiros para processamento histológico de microscopia de luz e o roteiro para as colorações das lâminas estão descritos no anexo 1.

3.3.1.1 Análise das alterações histopatológicas em Microscopia de Luz

As análises histopatológicas do tecido branquial foram feitas a partir de imagens capturadas das lâminas em fotomicroscópio Olympus BH-10AD acoplado a computador e utilizando o programa Image-Pro Express[®] no Departamento de Zoologia da UFPR.

Para cada peixe dos grupos tratados e do grupo controle foram capturadas e analisadas 10 imagens (ou campos) com um aumento de 200 vezes e escolhidas aleatoriamente. Em cada imagem foram contados o número de lamelas secundárias e as alterações histológicas presentes. As contagens visuais foram realizadas no programa Adobe Photoshop® 7.0.1 com o auxílio de marcações com códigos de cores sobre as lamelas secundárias. Foram contadas apenas as lamelas secundárias que estavam visíveis da base até a ponta.

As alterações histopatológicas observadas e contadas foram: hiperplasia, fusão, aneurisma e descolamento do epitélio. A hiperplasia corresponde à proliferação de células do epitélio interlamelar e respiratório podendo levar à fusão entre duas ou mais lamelas secundárias (MALLATT 1985; ROBERTS, 1989). O aneurisma é descrito como uma dilatação do espaço sanguíneo devido a lesão nas células pilares e acúmulo de células sanguíneas (MALLATT, 1985; FERGUSON, 1995). O descolamento do epitélio é caracterizado pela separação existente entre o epitélio da lamela secundária e a membrana basal (FERGUSON, 1995) devido a infiltração de fluído intersticial (MALLATT, 1985; FERGUSON, 1995). Para uma análise mais detalhada, a intensidade do descolamento foi classificada em: mínimo (descolamento com até 50% em um só lado da lamela secundária), brando (descolamento com até 50% em ambos os lados da lamela secundária), moderado (descolamento com mais de 50% em um só lado da lamela secundária), severo (descolamento com até 50% em um dos lados da lamela secundária e mais de 50% no outro) e intenso (descolamento com mais de 50% em ambos os lados da lamela secundária).

3.3.2 Processamento histológico para Microscopia Eletrônica de Transmissão

O segundo arco branquial esquerdo foi fixado em solução de Karnovsky (CULLING *et al.*, 1985 modificado) por 4 horas. Após a fixação, foram efetuadas lavagens sucessivas em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2 para remoção do excesso do fixador. Em seguida, o material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,4 M, pH 7,2 por 1 hora. Novamente foi submetido à lavagem em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2, seguindo de duas lavagens em água destilada. Na etapa seguinte, foi realizada a contrastação em bloco com uranila

aquosa 2% por 2 horas, seguida de lavagem em água destilada. Após esta etapa, o material foi desidratado por uma série crescente de álcool (etanol) e em seguida colocado em acetona. O procedimento seguinte envolveu a inclusão em resina.

Cortes semifinos (0,2 μm) e ultra-finos (30-50 nanômetros) foram obtidos em ultramicrótomo Sorval (R) Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e diamante sucessivamente. Os cortes ultra-finos foram colhidos em telas de cobre de malha 200. Os cortes semifinos foram corados com bórax/azul de toluidina a 1% para análise em microscopia óptica, enquanto que os cortes ultra-finos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila a 2% (WATSON, 1958) por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois de rápida lavagem e secagem, os cortes foram contrastados em solução de nitrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) por 10 minutos. Após nova lavagem em água bidestilada as telas foram secas ao ar.

A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de Transmissão JOEL 1200 EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, onde foram obtidas as micrografias eletrônicas para o estudo posterior.

As soluções e os roteiros para processamento histológico em Microscopia Eletrônica de Transmissão estão descritos no anexo 2.

3.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados numéricos foram expressos em médias \pm erro padrão da média (SEM). O tratamento estatístico dos resultados foi realizado através da análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey com 95% de significância para a comparação entre a média dos grupos (controle, 1h, 4h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h). Para os dados não-paramétricos foi realizado o teste de KRUSKA-WALLIS com 95% de significância e também para a comparação entre as médias dos grupos (controle, 1h, 4h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h). Os resultados obtidos foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$ (anexo 3). Utilizou-se o programa Statgraphics® v. 5.0 para a realização dos testes.

4. RESULTADOS

4.1 FAIXA SUBLETAL DO ORGANOFOSFORADO AZODRIN[®] 400 PARA JUVENIS DE *Piaractus mesopotamicus*

A exposição aguda (96 horas) de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* ao organofosforado Azodrin[®] 400 resultou na faixa subletal de 0,75 mg/L e 1,50 mg/L nas quais não houve morte de nenhum peixe. Na concentração testada de 6,00 mg/L foi observado um total de 10 indivíduos mortos ao final de 96 horas de exposição. Para a concentração de 3,00 mg/L foi verificada a morte de apenas 1 indivíduo ao final de 96 horas (Tabela 1). Após 96 horas, não houve morte de nenhum dos indivíduos do grupo controle. Estes apresentaram movimentação típica e alimentavam-se normalmente.

Tabela 1 – Número de peixes mortos em cada concentração testada durante o período de 0 a 96 horas.

Concentração de Azodrin [®] 400	Nº de peixes mortos (h)					Total após 96 h
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
0,00 mg/L (Controle)	0	0	0	0	0	0
6,00 mg/L	0	0	5	3	2	10
3,00 mg/L	0	0	0	0	1	1
1,50 mg/L	0	0	0	0	0	0
0,75 mg/L	0	0	0	0	0	0

Com base nestes resultados foi escolhida a dose subletal de 1,08 mg/L do produto Azodrin® 400, correspondendo a 0,0432 mg do princípio ativo, monocrotofós, para o estudo das alterações histológicas branquiais causadas por este organofosforado.

4.2 TESTE DE TOXICIDADE EM NÍVEL SUBLETAL

4.2.1 Análise histológica das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* no grupo controle

A observação macroscópica das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* mostrou que elas são formadas por quatro pares de arcos branquiais (Fig. 4A). Cada arco branquial é constituído de lamelas primárias ou filamentos branquiais (Fig. 4B e 4C). Verificou-se através dos cortes histológicos que cada lamela primária tem duas fileiras de lamelas secundárias dispostas perpendicularmente (Fig. 4B e 4C).

Quanto à organização histológica, as lamelas secundárias são revestidas por tecido epitelial, sustentado por células pilares (Fig. 4C e 4D). As células pilares apresentam prolongamentos citoplasmáticos (Fig. 5A e 5B) que delimitam os espaços sanguíneos (Fig. 5A), nos quais foram observadas hemácias nucleadas (Fig. 4D).

As células do tecido epitelial mostraram-se achatadas (Fig. 4C e 4D) e com núcleo alongado (Fig. 5A e 5B). No citoplasma das células epiteliais foram evidenciadas as organelas: retículo endoplasmático (Fig. 5C e 6E), mitocôndrias (Fig. 6A) e Golgi associado a vesículas de tamanhos variados (Fig. 5D). Na membrana de células epiteliais adjacentes foram encontradas estruturas de adesão do tipo desmossomos (Fig. 5C).

As células epiteliais estão separadas das células pilares e de seus prolongamentos pela membrana basal (Fig. 5B, 6B e 6D). Um núcleo grande ocupa a maior parte do citoplasma da célula pilar (Fig. 5B e 5C). No citoplasma da célula pilar observou-se, também, a presença de organelas como o retículo endoplasmático e vesículas (Fig. 6E). Outra característica observada foi a presença de colunas de colágeno, as quais são formadas como extensões da membrana basal em cada lado da célula pilar (Fig. 5B).

Na ponta de cada lamela secundária foi evidenciado um capilar sanguíneo marginal revestido por célula endotelial (Fig. 5A). As células de cloreto e as glândulas mucosas foram observadas na base da lamela secundária (Fig. 4C).

4.2.2 Histologia branquial dos grupos experimentais

As análises histológicas das brânquias de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* expostos a 1,08 mg/L do organofosforado Azodrin® 400 apresentaram histopatologias nos tempos de exposição testados (1h, 4h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96 h). Os resultados são descritos a seguir e também apresentados em forma de registros fotográficos (Fig. 7 – 26), tabela (Tabela 2) e gráficos (Fig. 27 – 30). A análise realizada através da microscopia de luz foi qualitativa e quantitativa.

4.2.2.1 Tempo de exposição 1 hora

As brânquias dos indivíduos expostos ao organofosforado após 1 hora apresentaram as cinco categorias de descolamentos do epitélio (mínimo, brando, moderado, severo e intenso) sendo o descolamento mínimo (Fig. 7A e 7B) o mais freqüente (Tabela 2). Foi também observado hiperplasia (Fig. 7A) entre lamelas secundárias. O aneurisma também foi verificado.

4.2.2.2 Tempo de exposição 4 horas

No grupo experimental 4 horas as lesões encontradas foram semelhantes as observadas no tempo de exposição de 1 hora, ou seja, descolamento (Fig. 8 e 9A), hiperplasia e aneurisma (Fig. 9B). Constatou-se um aumento da incidência de todas as categorias de descolamentos sendo que o descolamento mínimo (Fig. 8A e 9A) permaneceu a alteração mais freqüente (Tabela 2).

4.2.2.3 Tempo de exposição 12 horas

Neste tempo de exposição as lesões permaneceram as mesmas verificadas no tempo de 4 horas, ou seja, descolamento (Fig. 10A), hiperplasia e aneurisma. Além destas alterações, observou-se o aparecimento de fusão entre lamelas secundárias. Neste tempo de exposição verificou-se uma diminuição quantitativa nas

cinco categorias de descolamento em relação ao tempo de 4 horas, sendo o descolamento mínimo (Fig. 10A), ainda, o mais freqüente (Tabela 2).

4.2.2.4 Tempo de exposição 24 horas

As alterações branquiais evidenciadas nos indivíduos expostos após 24 horas ao organofosforado Azodrin[®] 400 foram o descolamento (Fig. 12 e 13) a hiperplasia (Fig. 10B e 11), a fusão (Fig. 10B e 11), e o aneurisma. Novamente verificou-se o aumento quantitativo dos diferentes tipos de descolamentos, com exceção do descolamento mínimo (Fig. 12A) que sofreu uma pequena redução em relação ao grupo experimental 12 horas (Tabela 2). Nesse tempo de exposição foi evidenciado ainda o enrugamento do epitélio através da microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 13).

4.2.2.5 Tempo de exposição 48 horas

No grupo experimental 48 horas as lesões encontradas foram semelhantes as observadas no tempo de exposição de 24 horas, sendo que a alteração aneurisma não foi verificada. Os três tipos de descolamentos brando, intenso (Fig. 14A, 15) e severo (Fig. 14B e 15B) aumentaram quantitativamente, sendo o descolamento intenso o mais freqüente (Tabela 2). Os descolamentos mínimo (Fig. 14) e moderado (Fig. 14A) sofreram redução em relação ao grupo exposto em 24 horas (Tabela 2). Os descolamentos (Fig. 16, 17B, 17C, 17D e 18) e o enrugamento (Fig. 17A e 18A) também foram evidentes na microscopia eletrônica de transmissão.

4.2.2.6 Tempo de exposição 72 horas

As alterações branquiais evidenciadas nos indivíduos expostos após 72 horas ao organofosforado foram o descolamento, a hiperplasia e o aneurisma. Neste tempo de exposição não foi observada a fusão entre lamelas secundárias. Os descolamentos mínimo (Fig. 19A e 20A), brando (Fig. 20A) e moderado (Fig. 20B) aumentaram quantitativamente, enquanto os descolamentos severo (Fig. 19 e 20) e intenso (Fig. 19 e 20B) diminuíram em relação ao grupo experimental de 48 horas (Tabela 2).

4.2.2.7 Tempo de exposição 96 horas

Após 96 horas de exposição ao organofosforado Azodrin[®] 400 as lesões encontradas foram o descolamento, a hiperplasia (Fig. 21, 22 e 23), a fusão (Fig. 22), o aneurisma (Fig. 23A, 25A e 26A). Os descolamentos mínimo (Fig. 25B) e moderado (Fig. 24B) aumentaram quantitativamente, enquanto que os descolamentos brando (Fig. 24B e 25B), severo (Fig. 23A e 24B) e intenso (Fig. 23A) diminuíram em relação ao grupo exposto em 72 horas (Tabela 2). Neste tempo de exposição foram também observados núcleos hipertrofiados das células epiteliais através da microscopia de luz (Fig. 24A).

As observações ultraestruturais dos efeitos do organofosforado Azodrin[®] 400 no tecido branquial confirmaram as lesões descolamento do epitélio (Fig. 13, 16, 17B, 17C, 17D, 18, 26A) e aneurisma (Fig. 26A) verificadas no estudo histopatológico deste órgão. Na microscopia eletrônica de transmissão não foram observadas as alterações hiperplasia e fusão. Outras alterações observadas na microscopia eletrônica de transmissão foram o enrugamento do epitélio nas lamelas secundárias (Fig. 13, 17A, 17B e 18A) e a alteração no tamanho dos núcleos das células epiteliais os quais apresentaram-se hipertrofiados (Fig. 16 e 18).

As observações ultraestruturais evidenciaram, também, a desestruturação de lamelas secundárias (Fig. 26) com visível desorganização das células pilares (Fig. 16, 17, 18C e 26D) e, conseqüentemente, dos espaços sanguíneos (Fig. 16A, 16B, 16D e 26D) e desorganização do capilar sanguíneo marginal (Fig. 26D) após 96 horas de exposição.

4.2.3 Tratamento estatístico

4.2.3.1 Descolamento mínimo

Comparando o grupo controle com os grupos tratados para a alteração descolamento mínimo, observou-se que existe diferença significativa ($p < 0,05$) apenas no grupo 48 horas (Fig. 27A). Tal diferença é coerente com o aumento significativo ($p < 0,05$) do descolamento intenso em 48 horas (Fig. 29A), comparativamente ao grupo controle. Comparando os grupos tratados entre si, para a alteração descolamento mínimo, 48 horas foi diferente ($p < 0,05$) de 1 hora e de 96 horas (Fig. 27A).

4.2.3.2 Descolamento brando

Em relação ao descolamento brando os grupos tratados não apresentaram diferença significativa em comparação com o grupo controle (Fig. 27B). Através da comparação dos grupos tratados entre si, 12 horas mostrou-se diferente ($p < 0,05$) de 48 horas e significativamente diferente ($p < 0,01$) de 72 horas (Fig. 27B) em relação a alteração descolamento brando. O grupo tratado 72 horas foi diferente, também ($p < 0,05$), em relação grupo tratado 1 hora (Fig. 27B).

4.2.3.3 Descolamento moderado

Para o descolamento moderado os grupos tratados não mostraram diferença significativa quando comparados ao grupo controle (Fig. 28A). Na comparação dos grupos tratados entre si constatou-se que o descolamento moderado no grupo 1 hora é diferente ($p < 0,05$) de 24 horas (Fig. 28A).

4.2.3.4 Descolamento severo

Comparando o grupo controle com os grupos tratados para o descolamento severo não houve diferença significativa (Fig. 28B). Entre os grupos tratados, 48 horas mostrou-se diferente ($p < 0,05$) de 4 horas e 12 horas e significativamente diferente ($p < 0,01$) do grupo tratado 1 hora (Fig. 28B).

4.2.3.5 Descolamento intenso

Quanto ao descolamento intenso o grupo 48 horas mostrou-se significativamente diferente ($p < 0,01$) em comparação ao grupo controle e em comparação aos grupos tratados nos tempos de exposição de 1 hora e 4 horas (Fig. 29A).

4.2.3.6 Hiperplasia, fusão e aneurisma

Considerando um nível de significância de 5% para cada uma das alterações: hiperplasia, fusão e aneurisma, constatou-se que os valores no controle e nas diferentes horas de exposição não diferem entre si (Fig. 29B e 30).

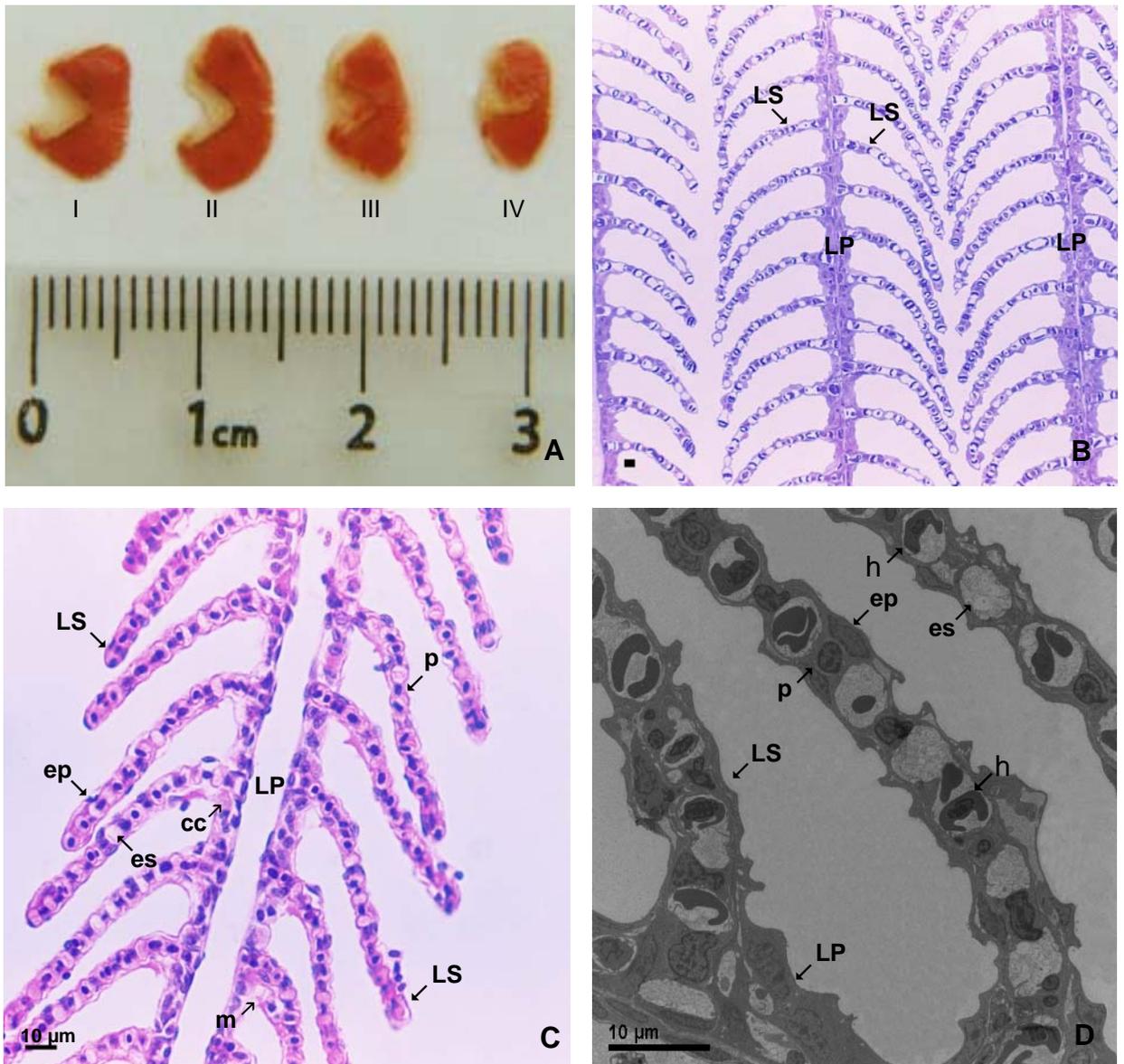


Figura 4 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle. **A** – Arcos Branquiais. **B** – Corte longitudinal mostrando as lamelas primárias (LP) e as lamelas secundárias (LS). Microscopia de luz. Escala: 10 μ m. Coloração: azul de toluidina. **C** – Observar: lamela primária (LP), lamela secundária (LS), espaço sanguíneo (es), célula epitelial (ep), célula pilar (p), célula de cloreto (cc) e célula de muco (m). Microscopia de luz. Escala: 10 μ m. Coloração: hematoxilina e eosina (HE). **D** – Microscopia eletrônica de transmissão. Lamela primária (LP), lamela secundária (LS) espaço sanguíneo (es), célula epitelial (ep), célula pilar (p) e hemácia nucleada (h).

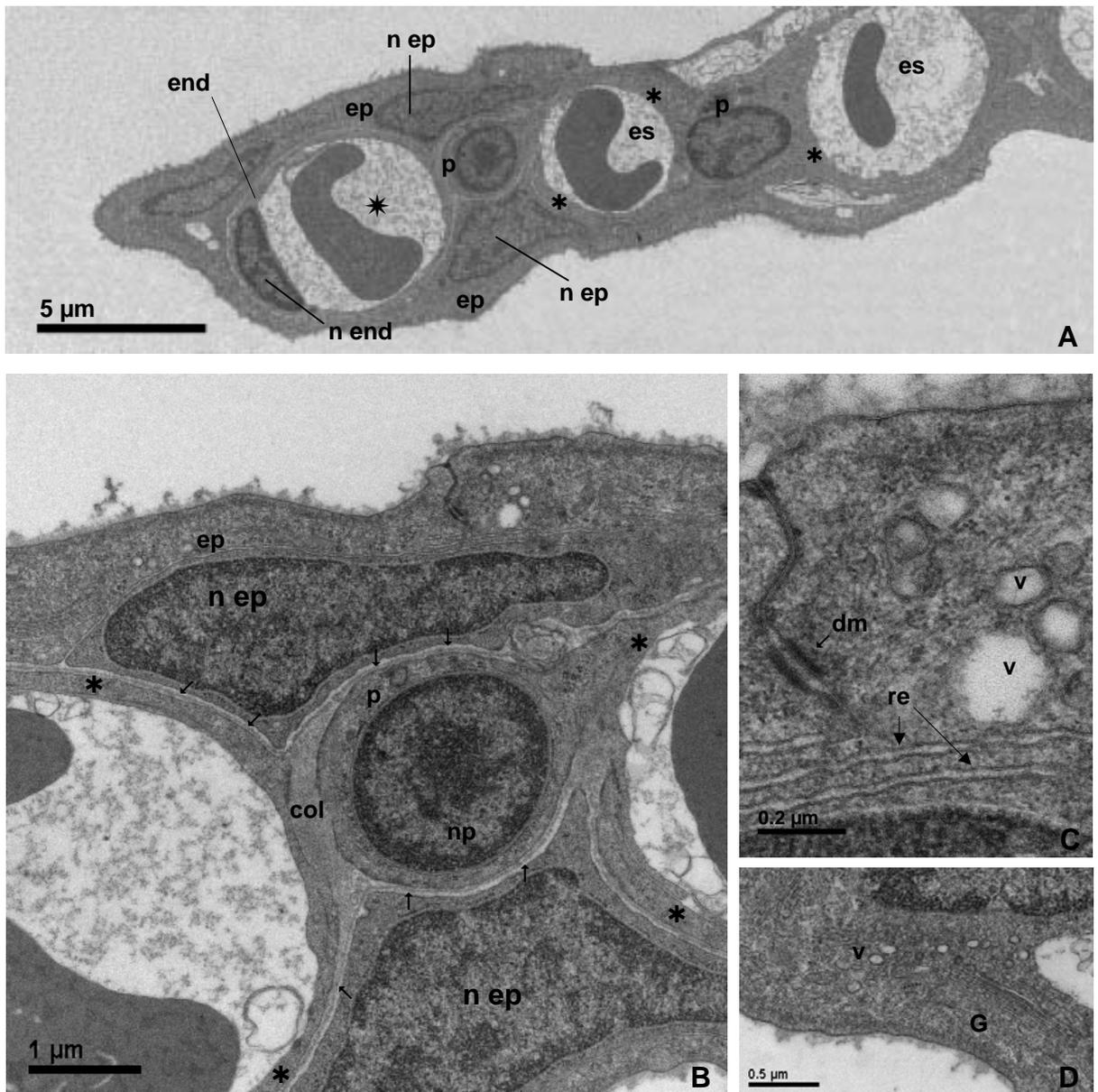


Figura 5 – Organização ultraestrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle. **A** – Lamela secundária. Célula epitelial (ep), célula pilar (p), prolongamentos da célula pilar (*), espaço sanguíneo (es), capilar sanguíneo marginal (*), núcleo da célula epitelial (n ep), célula endotelial (end) e núcleo da célula endotelial (n end). **B** – Lamela secundária. Célula epitelial (ep), célula pilar (p), núcleo da célula pilar (np), coluna de colágeno (col), membrana basal (↓), prolongamentos da célula pilar (*) e núcleo da célula epitelial (n ep). **C** – Detalhe da região citoplasmática da célula epitelial. Retículo endoplasmático (re), desmossomo (dm), vesículas (v). **D** – Outra região do citoplasma da célula epitelial. Observar: Complexo de Golgi (G) e vesículas do Golgi (v).

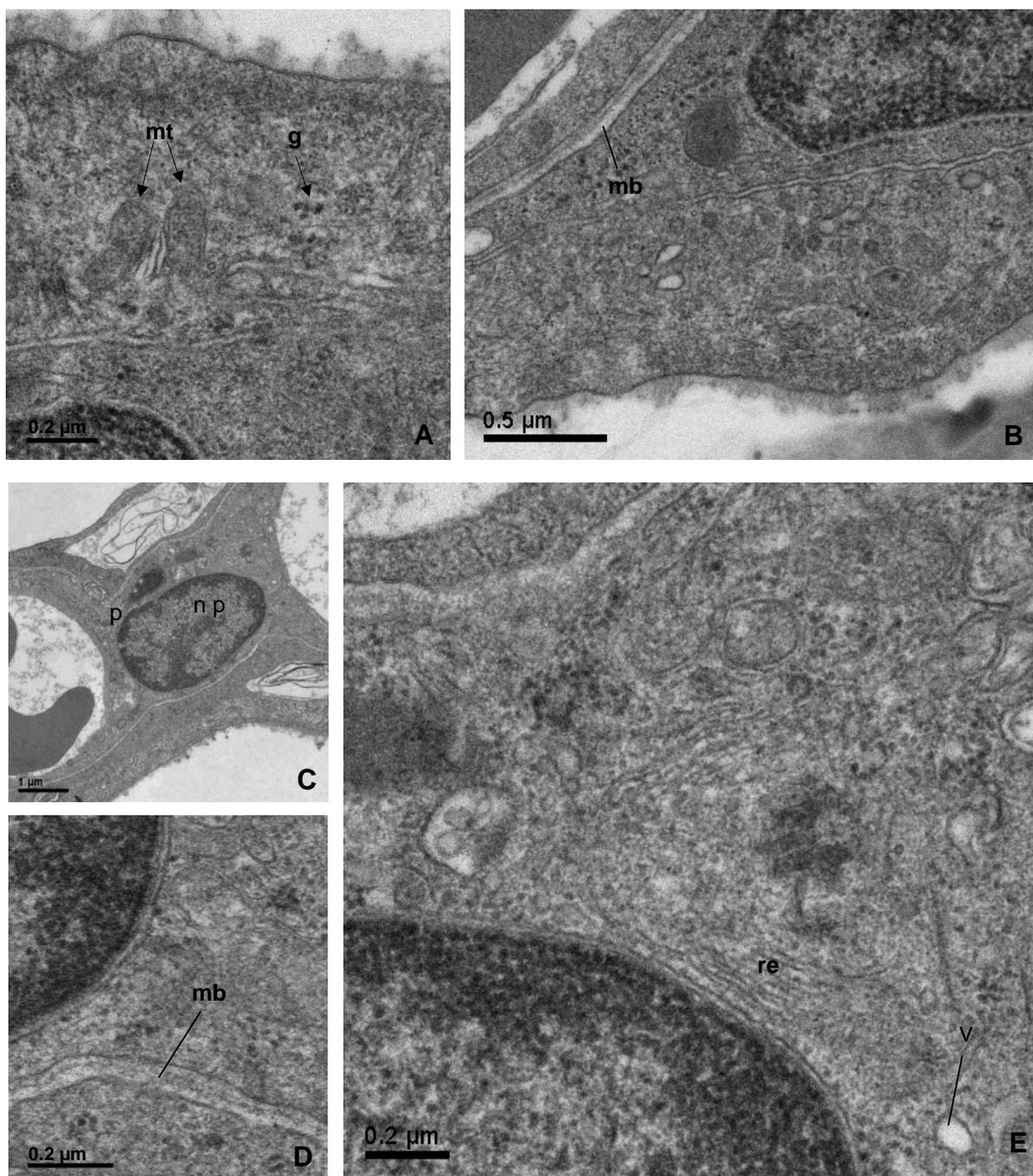


Figura 6 – Organização ultraestrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* do grupo controle. **A e B** – Detalhe da região citoplasmática da célula epitelial. Observar: mitocôndrias (mt), grânulos (g), retículo endoplasmático (re) e membrana basal (mb). **C** – Célula pilar (p) e núcleo da célula pilar (n p). **D e E** – Região citoplasmática da célula pilar. Observar: membrana basal (mb), retículo endoplasmático (re) e vesícula (v).

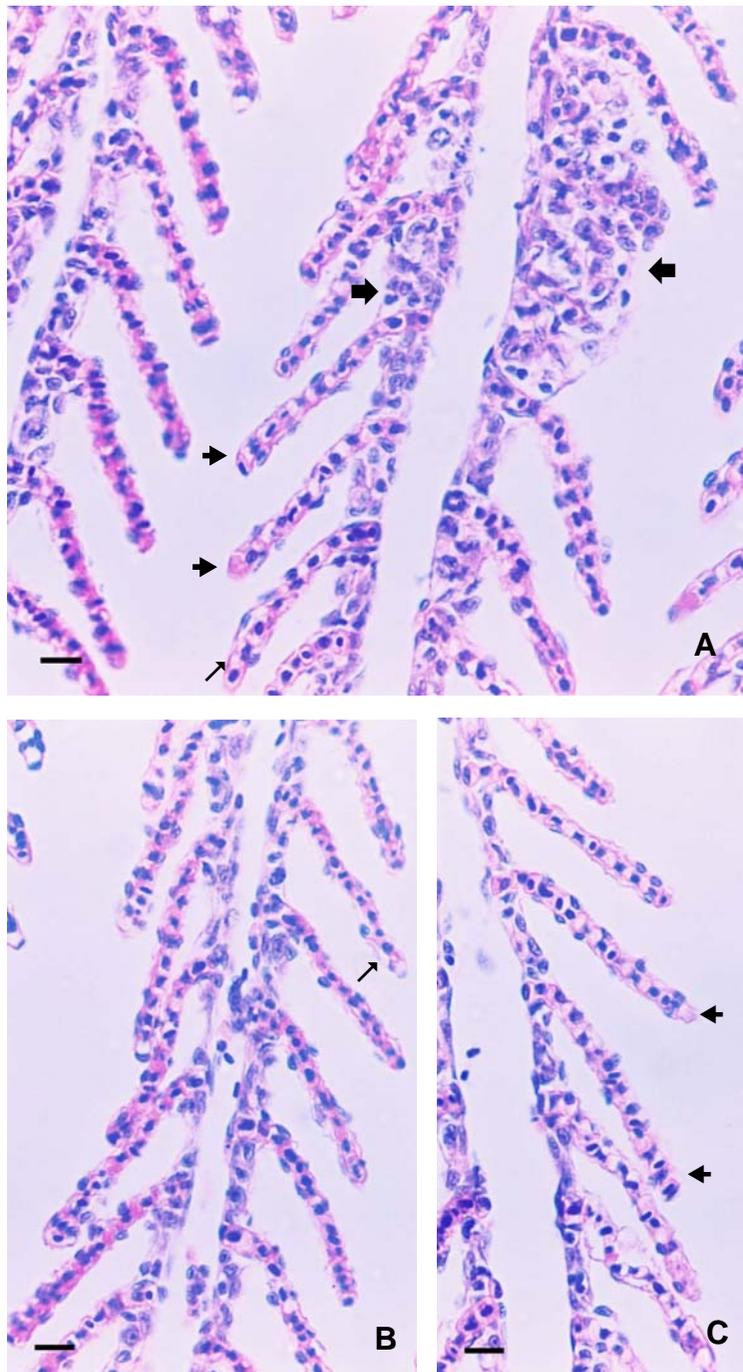


Figura 7 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 - 1h. **A** - Observar: hiperplasia (➡), lamela secundária com descolamento mínimo (↗) e lamelas secundárias sem descolamento (↖). **B** – Observar: lamela secundária com descolamento mínimo (↗). **C** – Observar: lamelas secundárias sem descolamento. Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

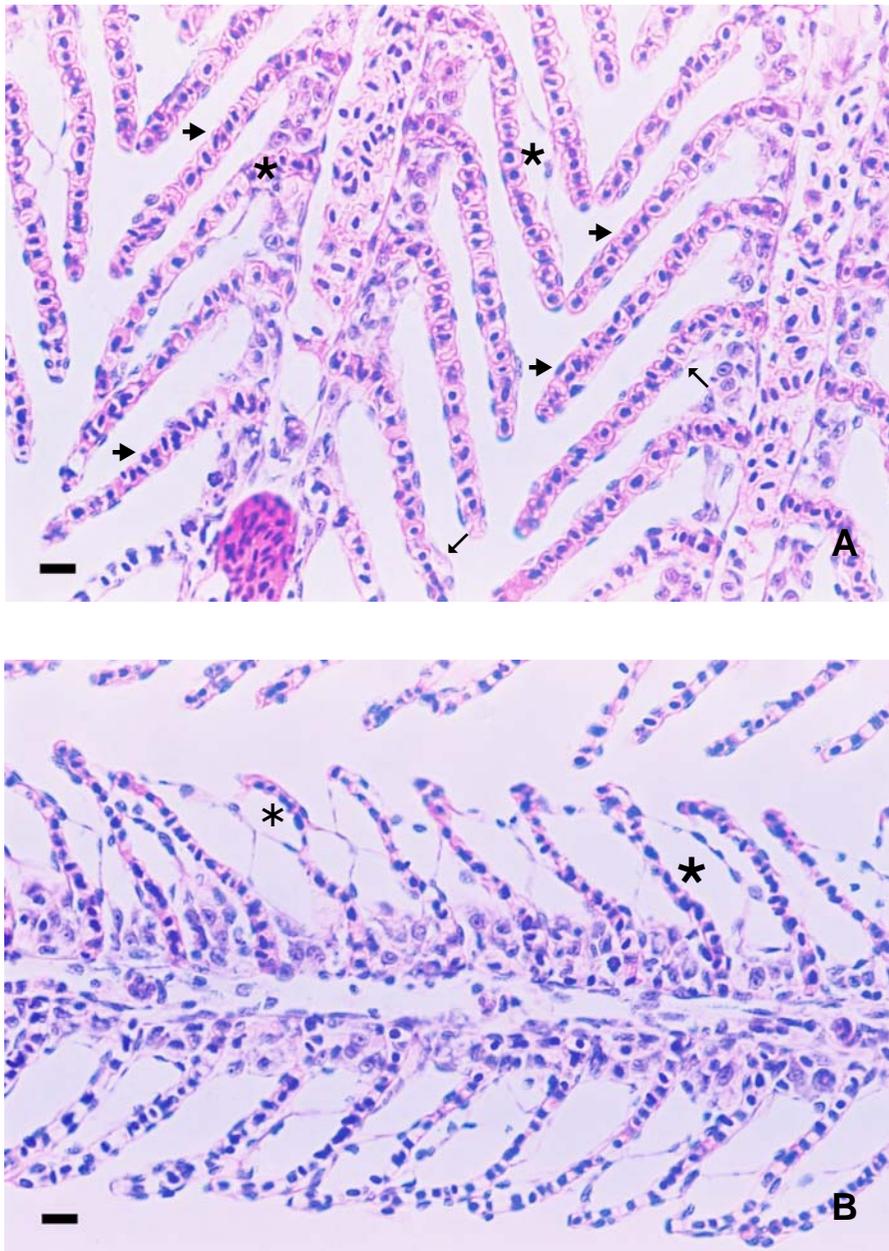


Figura 8 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 4h. **A e B** – Observar: lamelas secundárias com descolamento mínimo (◄), descolamento brando (*), descolamento moderado (★) e sem descolamento (►). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

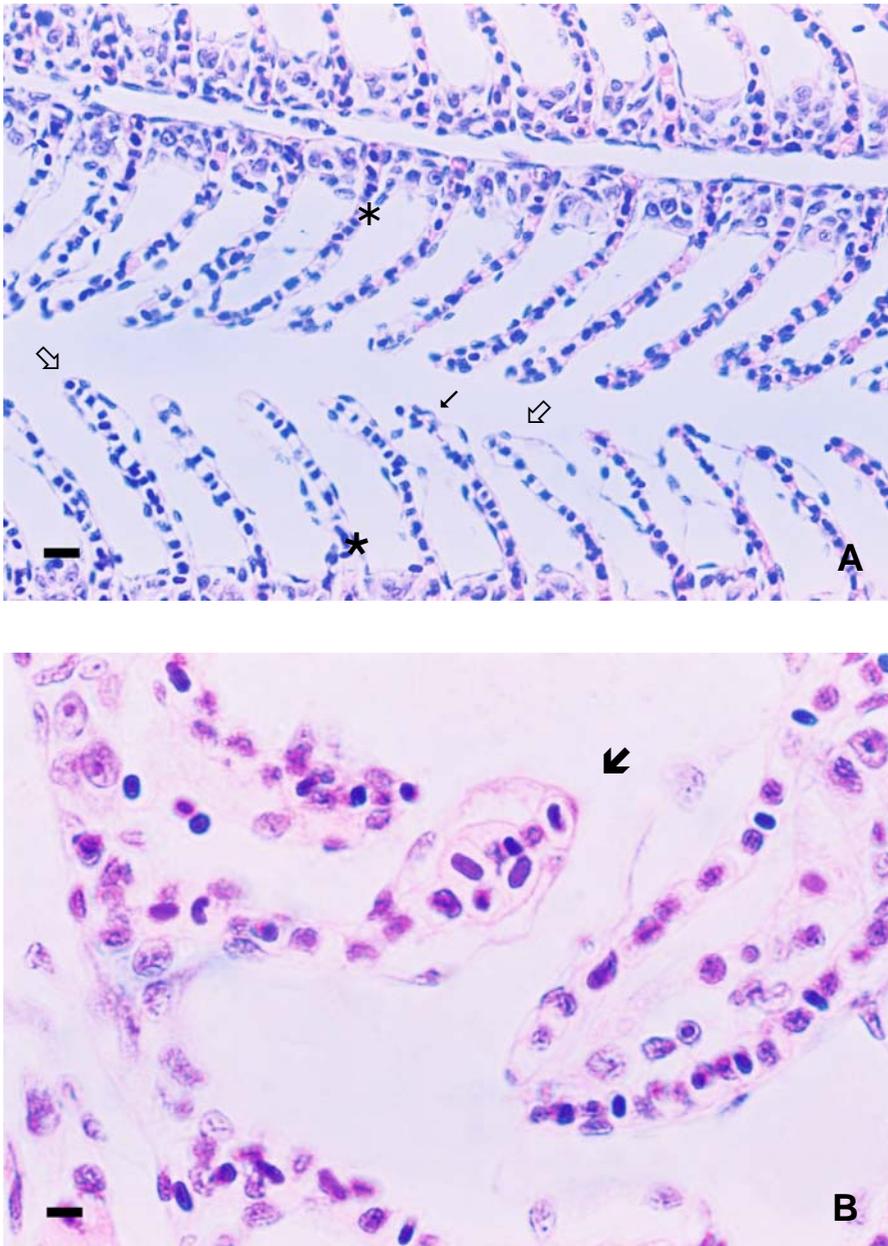


Figura 9 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 - 4h. **A** – Observar lamelas secundárias com: descolamento mínimo (✓) descolamento brando (*), descolamento moderado (★) e descolamento severo (⊠). **B** – Observar: aneurisma (⚡). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

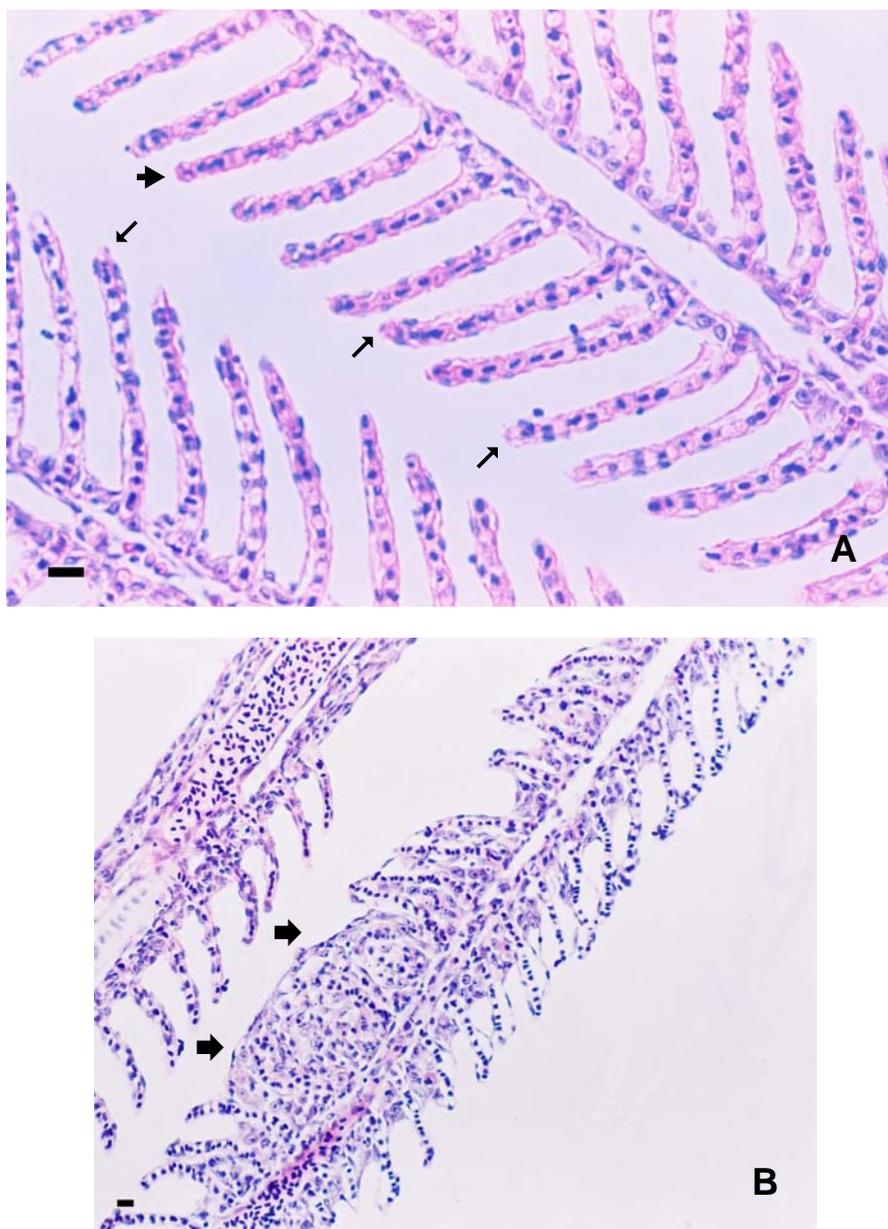


Figura 10 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 12h e 24h. **A – 12h.** Observar: lamela secundária sem descolamento (➔) e lamelas secundárias com descolamento mínimo (↵). **B – 24h** Observar: hiperplasia e fusão de lamelas secundárias (➔). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

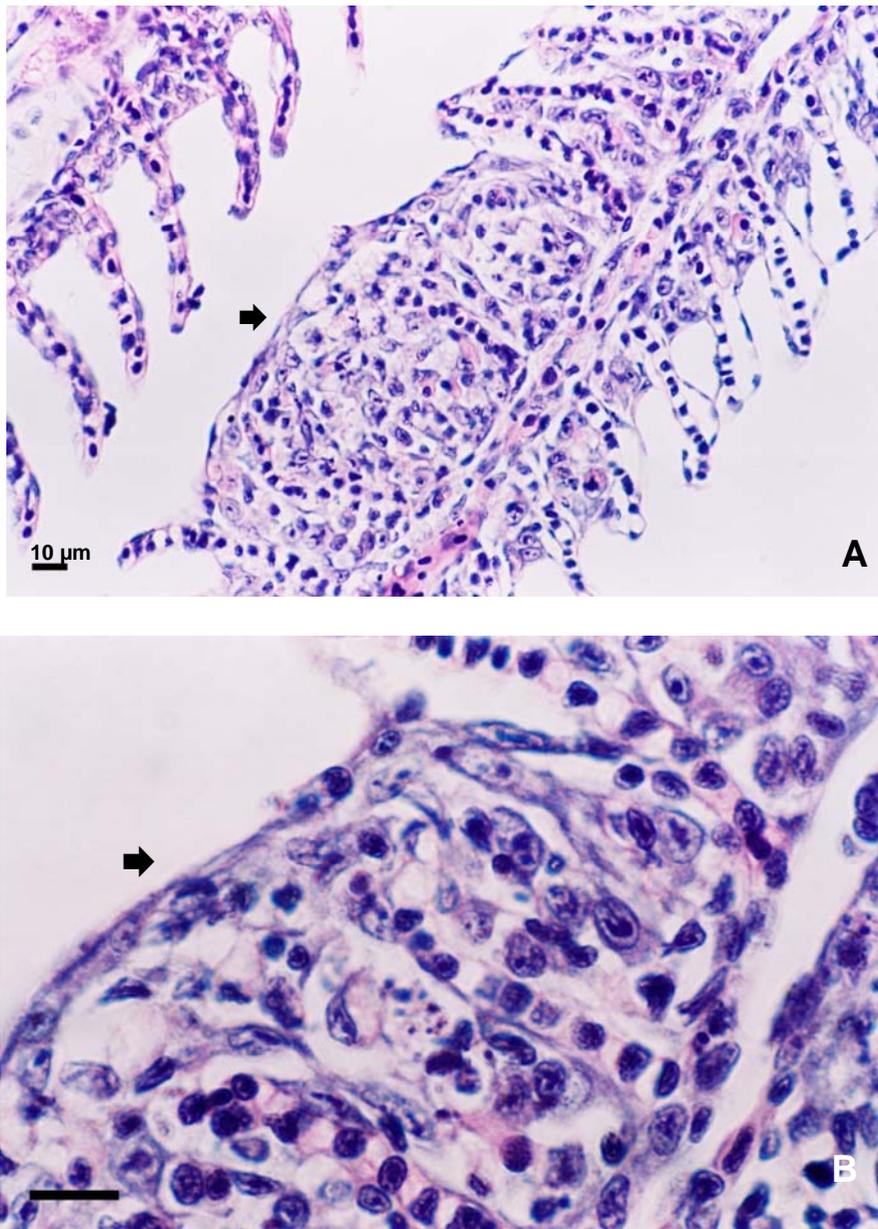


Figura 11 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 24h. **A e B** – Observar: hiperplasia e fusão de lamelas secundárias (➔). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

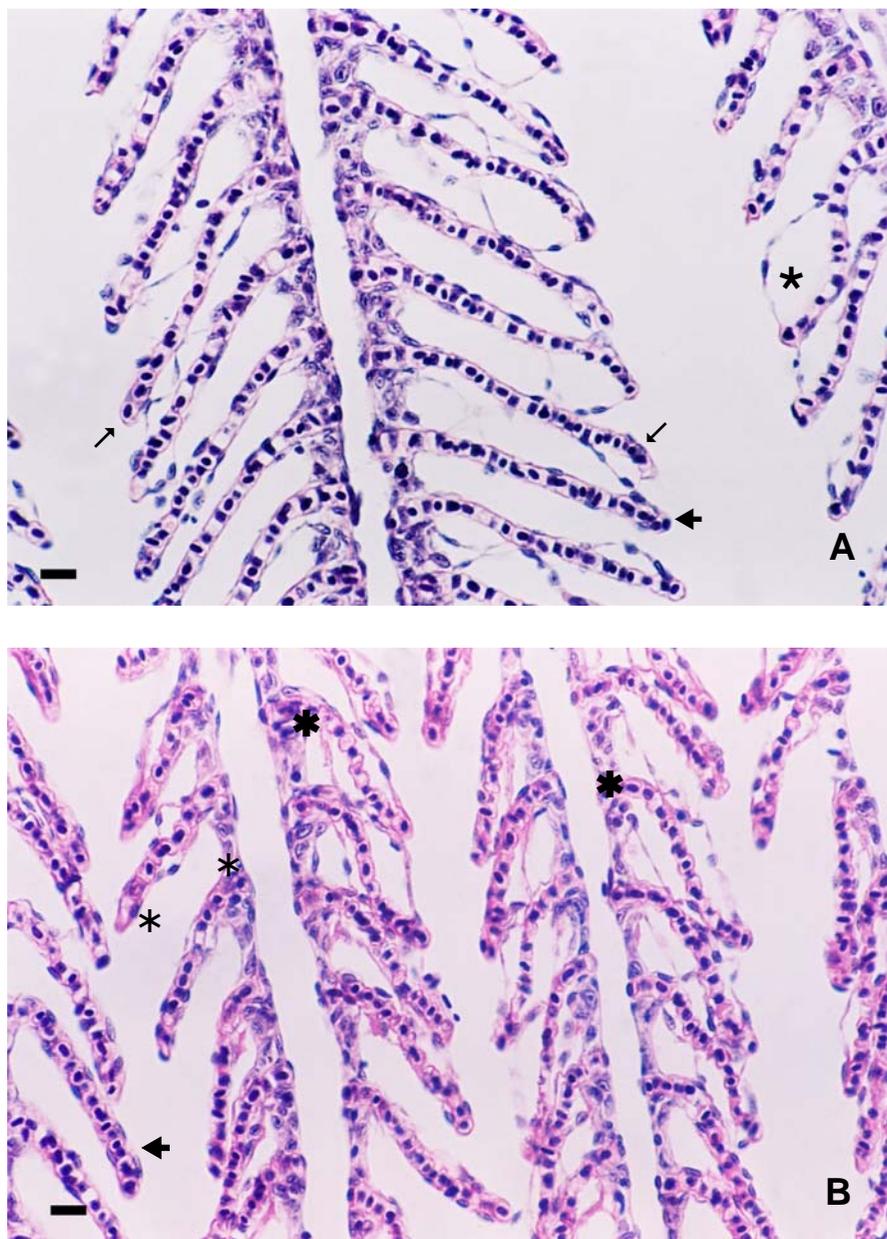


Figura 12 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 24h. **A** – Observar: lamelas secundárias com descolamento mínimo (✓), lamela secundária com descolamento moderado (*) e lamela secundária sem descolamento (→). **B** – Observar: lamelas secundárias brando (*), lamelas secundárias com descolamento intenso (*), lamela secundária sem descolamento (→). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

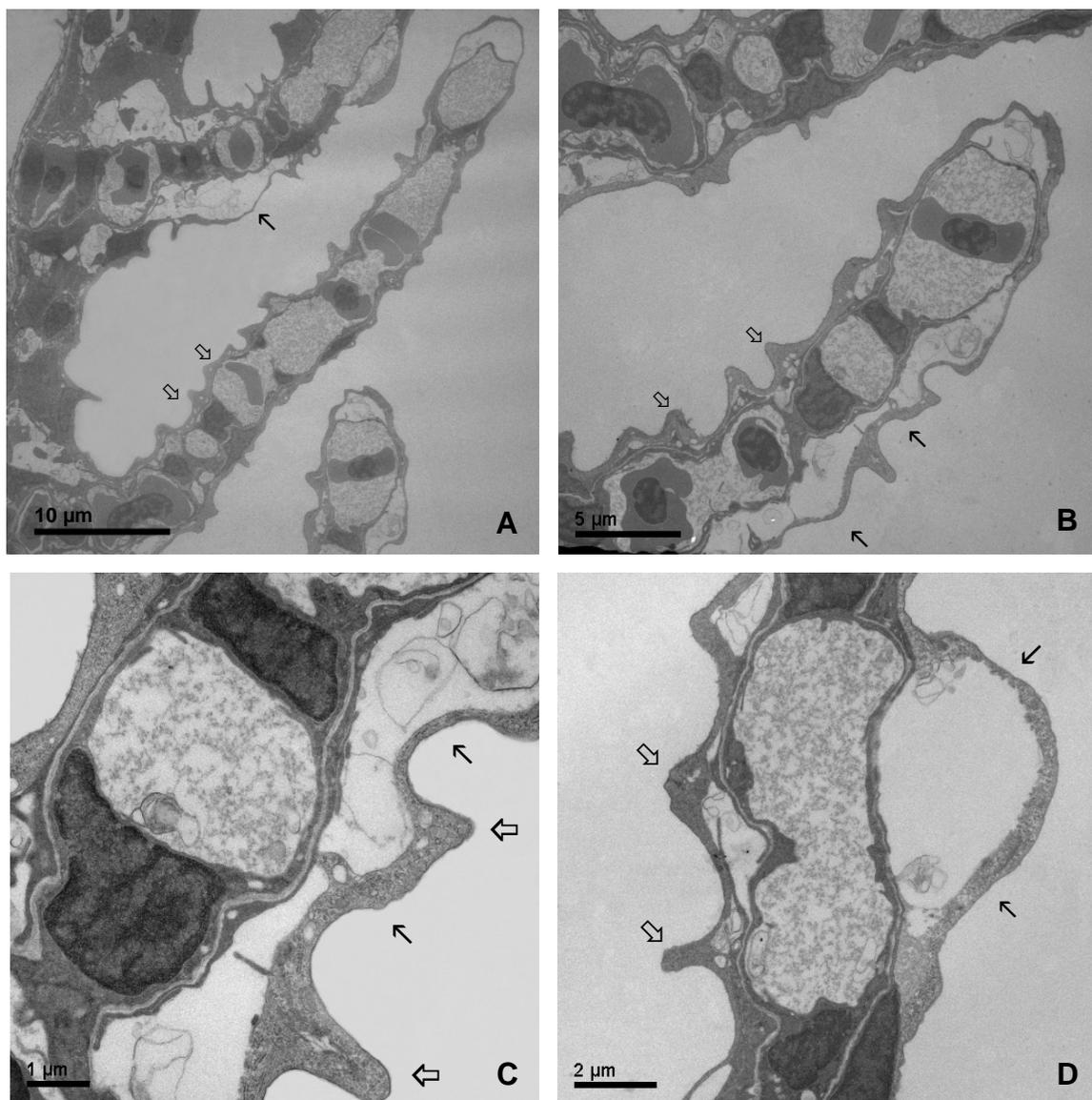


Figura 13 – Organização ultraestrutural das brânquias de *Piactus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 24h. **A, B, C e D** – Observar: descolamento (↖) e enrugamento do epitélio respiratório (↗).

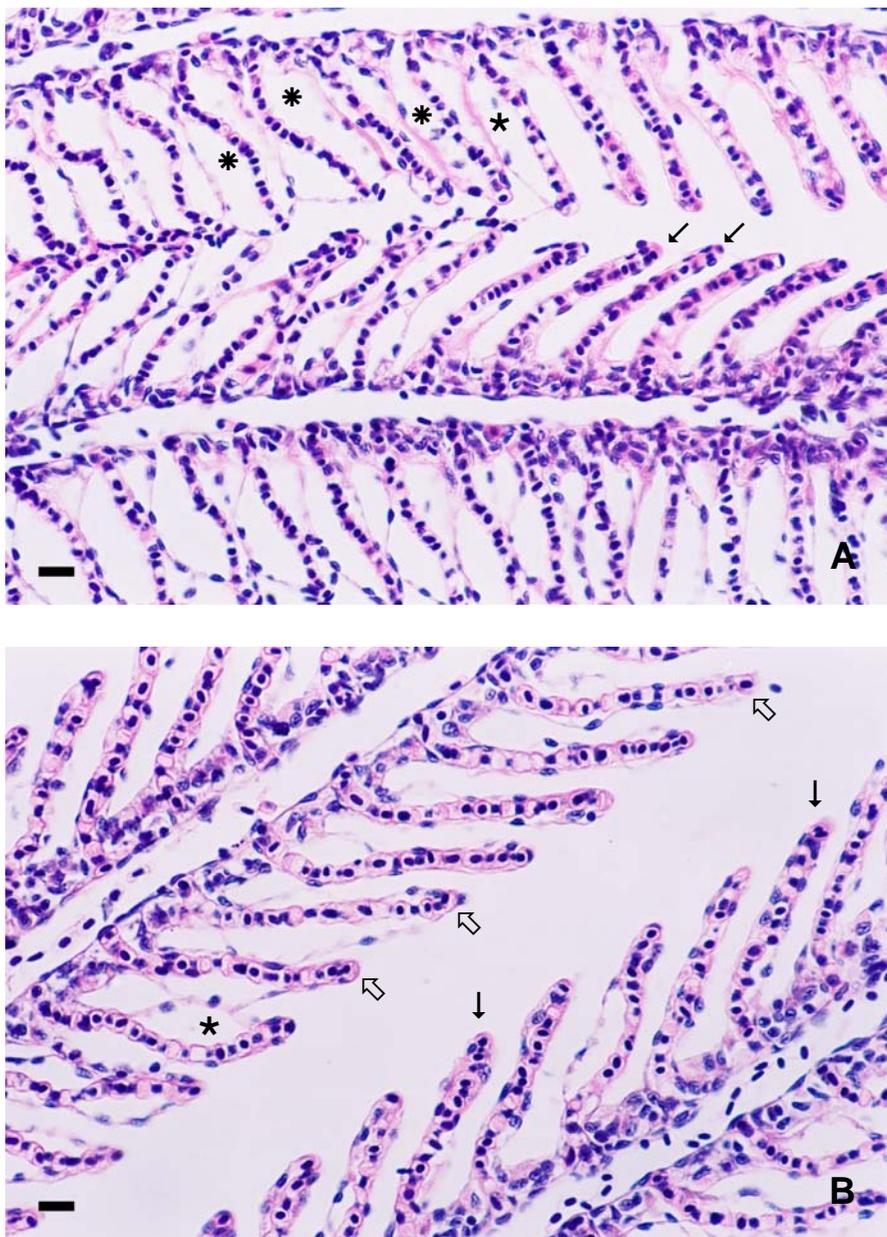


Figura 14 – Organização estrutural das brânquias de *Piarractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin 400® - 48h. **A** – Observar: lamelas secundárias com descolamento mínimo (∨), lamelas secundárias com descolamento intenso (*) e lamela secundária com descolamento moderado (★). **B** – Observar: lamelas secundárias com descolamento mínimo (∨), lamelas secundárias com descolamento severo (⊃) e lamela secundária com descolamento moderado (★). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

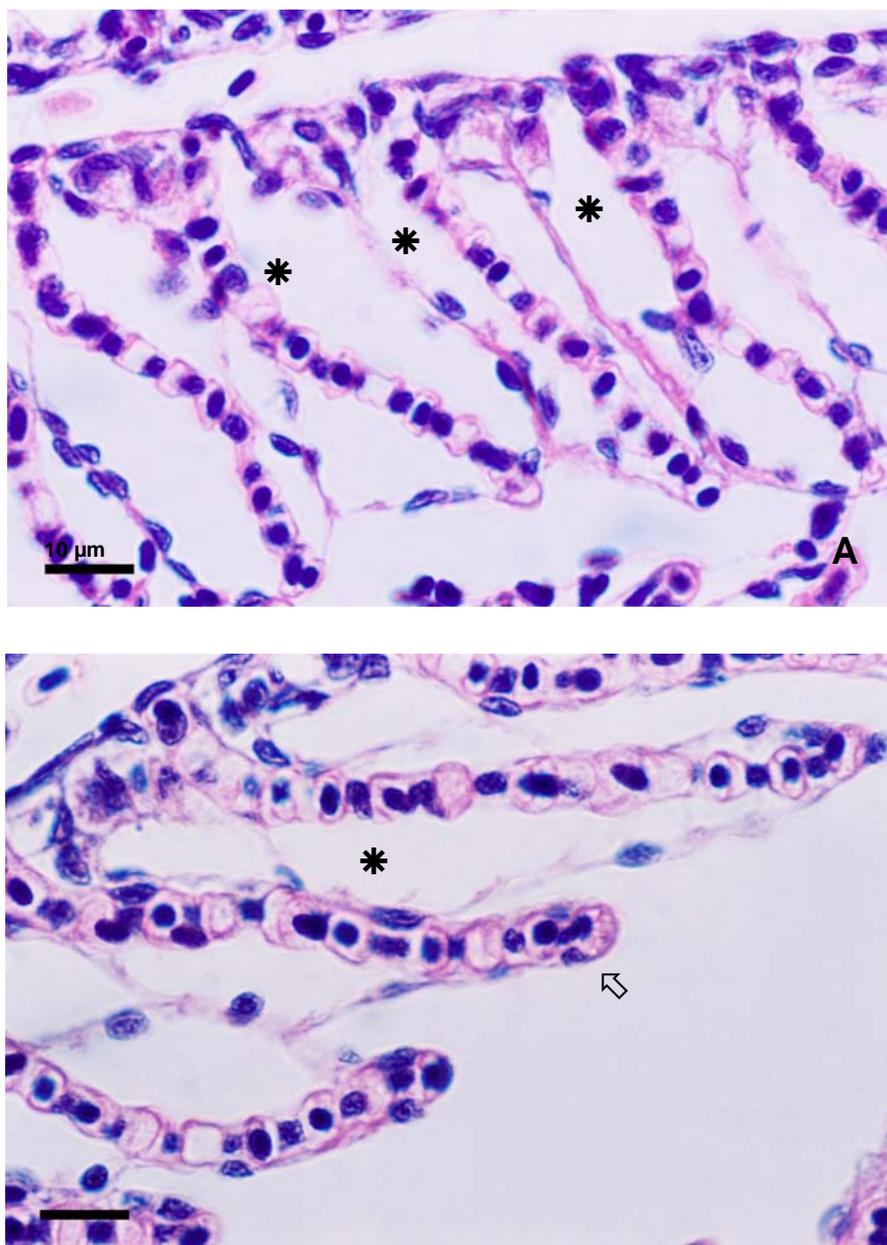


Figura 15 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – **48h**. **A** – Observar: lamelas secundárias com descolamento intenso (*). **B** – Observar: lamela secundária com descolamento severo (↔) e lamela secundária com descolamento intenso (*). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

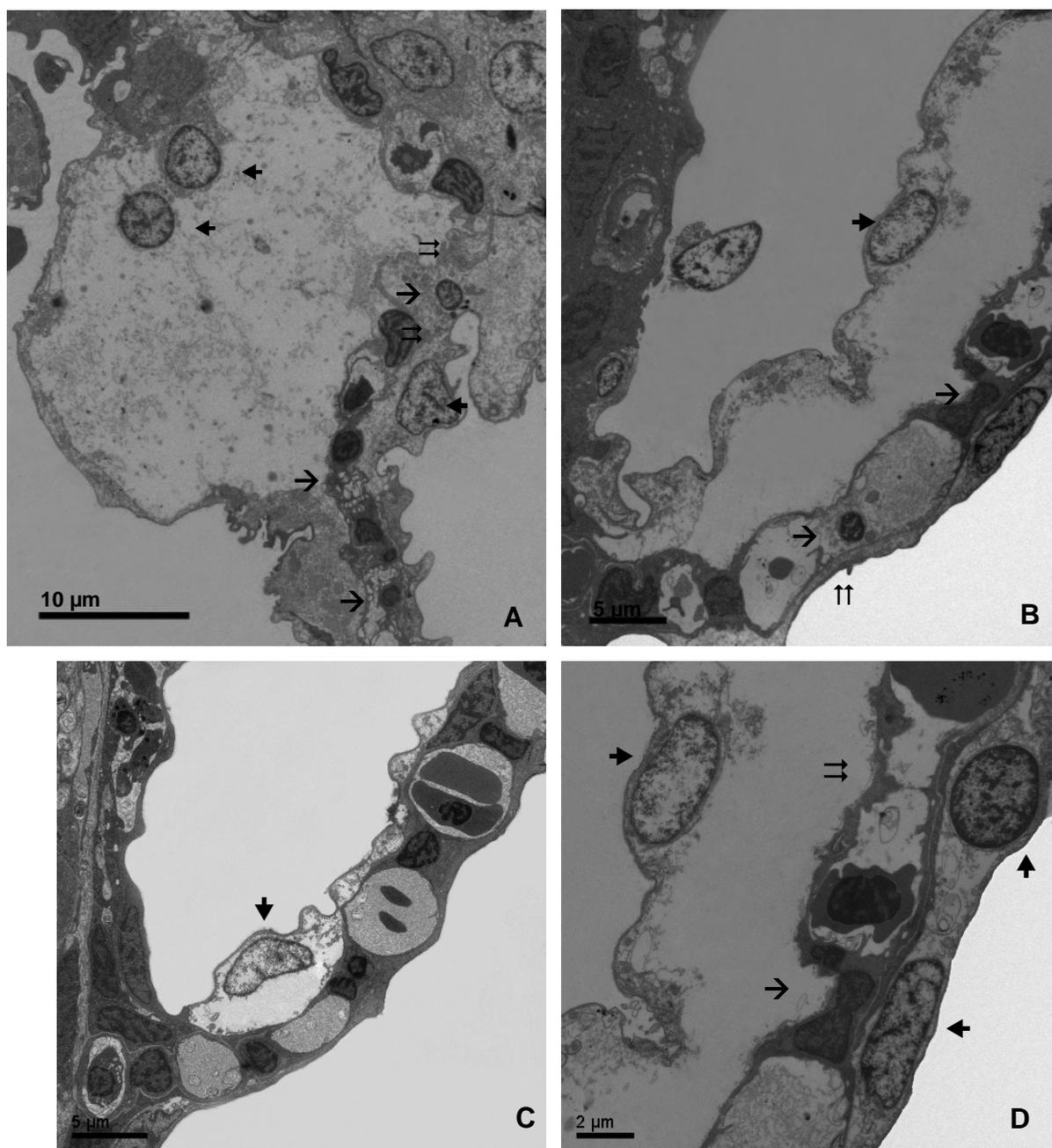


Figura 16 – Organização ultraestrutural das brânquias de *Piactus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 - 48h. **A, B, C e D** – Descolamento do epitélio na lamela secundária. Observar: núcleos das células epiteliais hipertrofiados (↗) e desorganização das células pilares (→) e dos espaços sanguíneos (⇔).

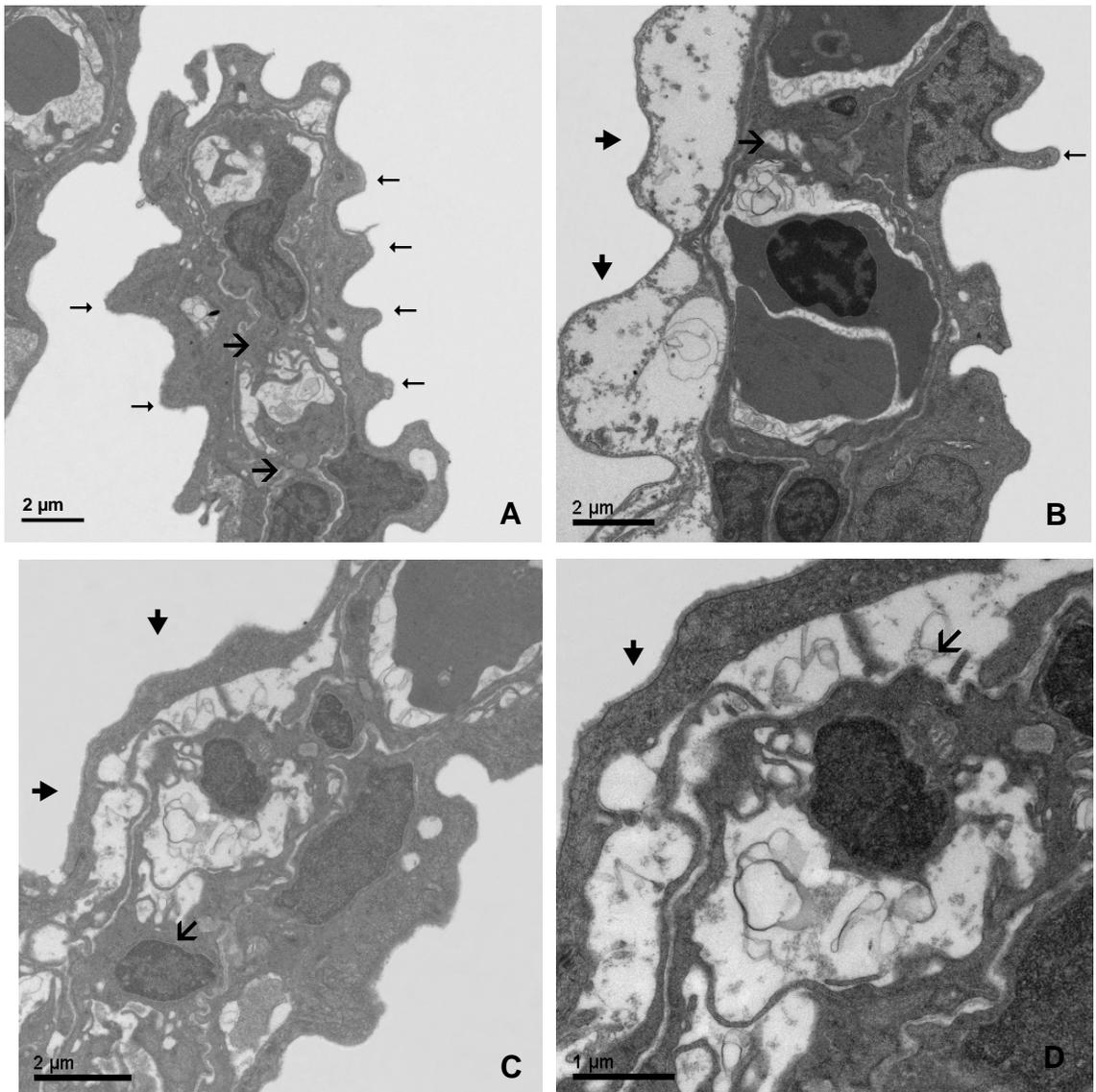


Figura 17 – Organização ultraestrutural das brânquias de *Piarractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 48h. **A** – Observar: lamela secundária com enrugamento do epitélio (→) e desorganização das células pilares (←). **B, C e D** – Observar: descolamento do epitélio na lamela secundária (→) e desorganização das células pilares (←).

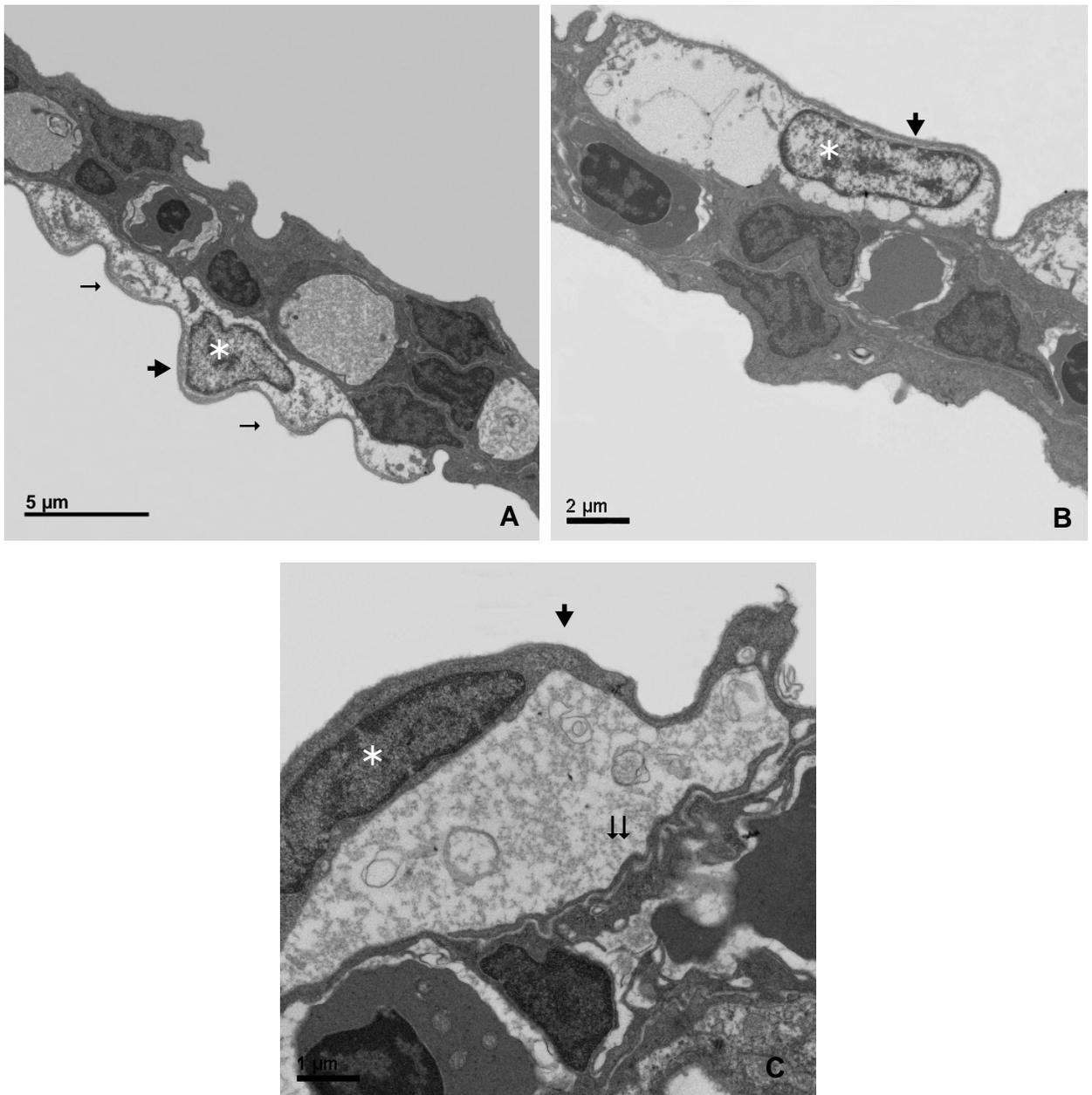


Figura 18 – Organização ultraestrutural das brânquias de *Piaraactus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 48h. **A** e **B** – Observar: lamela secundária com descolamento do epitélio (→) e núcleo hipertrofiado da célula epitelial (✱) e enrugamento do epitélio (→). **C** - Descolamento do epitélio (→) e desorganização da célula pilar (⇓).

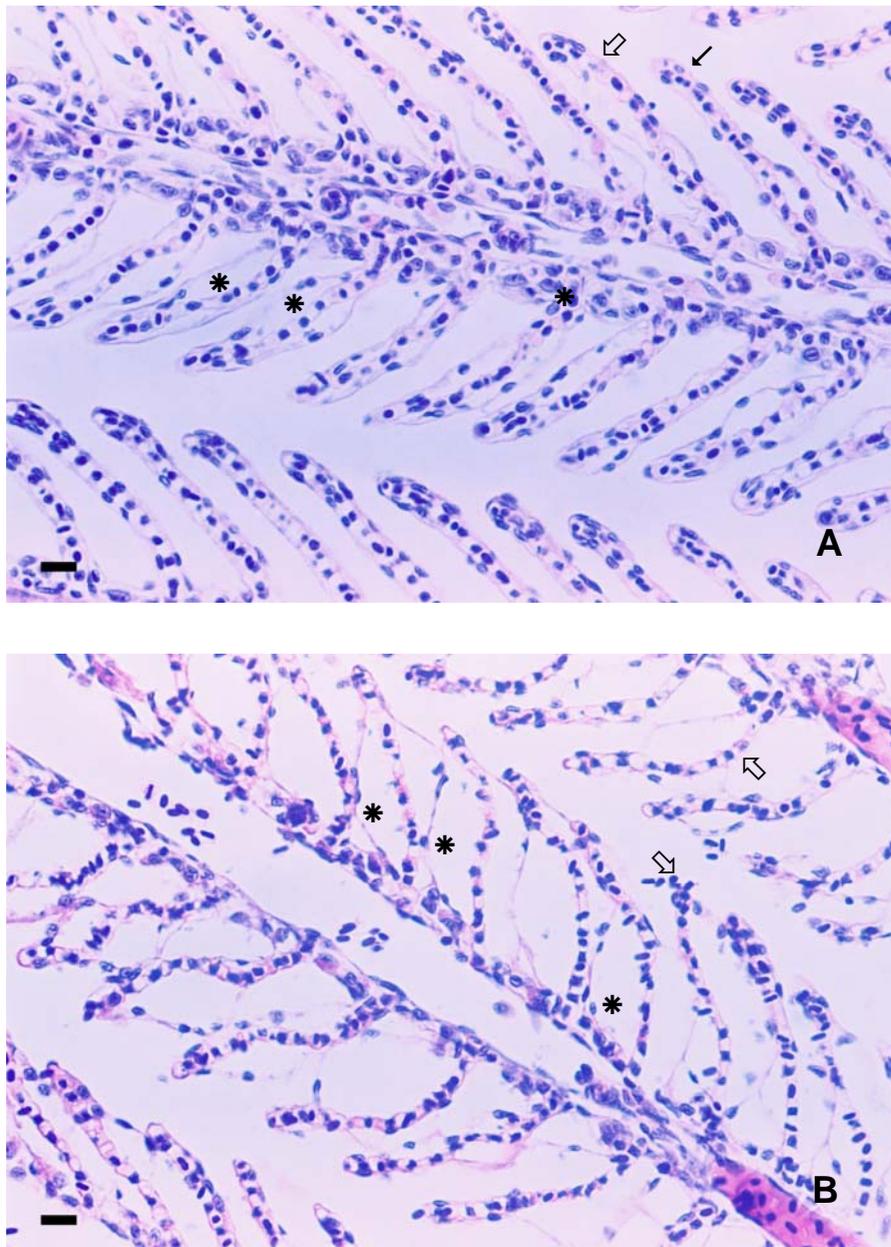


Figura 19 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 72h. **A e B** – Observar: lamela secundária com descolamento mínimo (↵), lamela secundária com descolamento severo (↶) e lamelas secundárias com descolamento intenso (*). **B** – Observar: lamelas secundárias com descolamento intenso (*) e lamelas secundárias com descolamento severo (↶). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

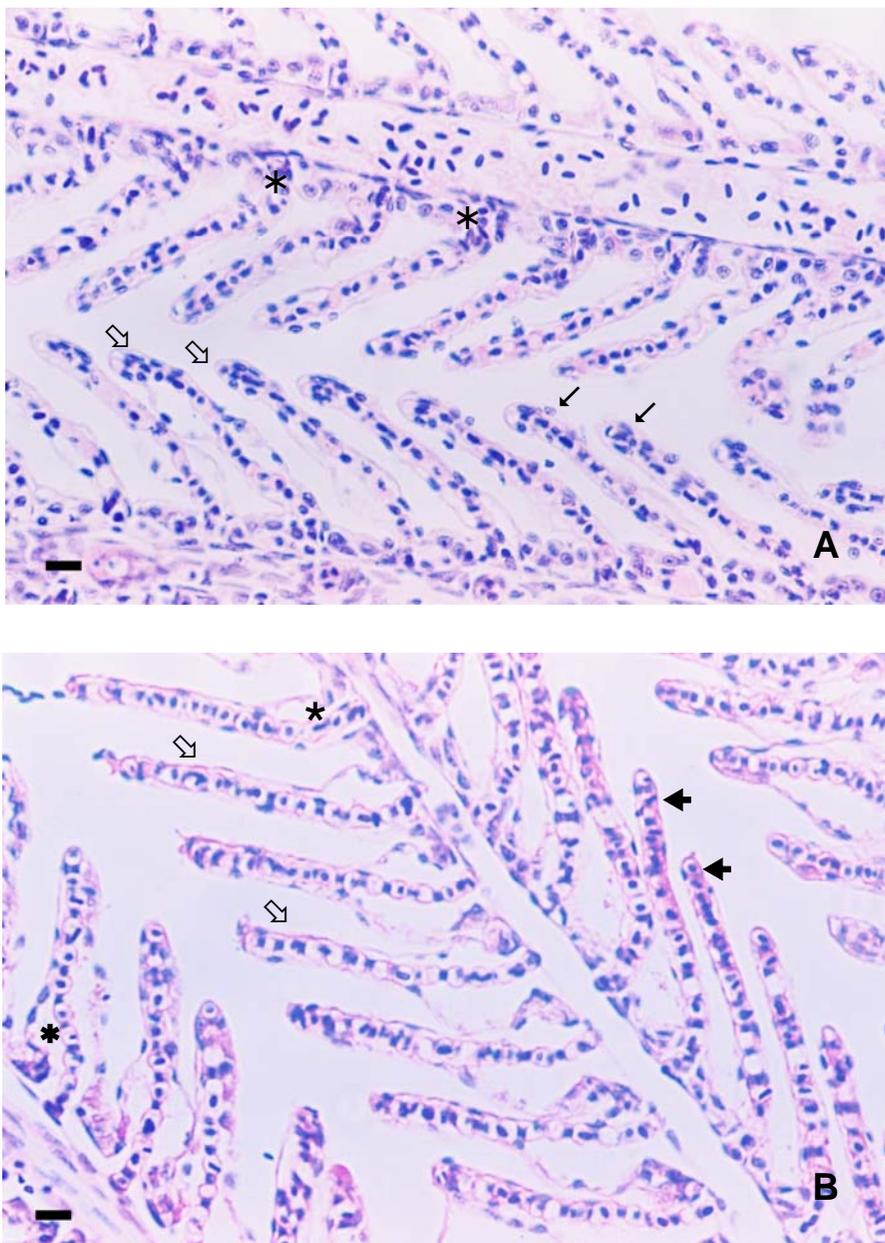


Figura 20 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 72h. **A** – Observar: lamelas secundárias com descolamento mínimo (↙), lamelas secundárias com descolamento brando (*) e lamelas secundárias com descolamento severo (↗). **B** – Observar: lamela secundária com descolamento moderado (*), lamelas secundárias com descolamento severo (↗), lamela secundária com descolamento intenso (*) e lamelas secundárias sem descolamento (↔). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

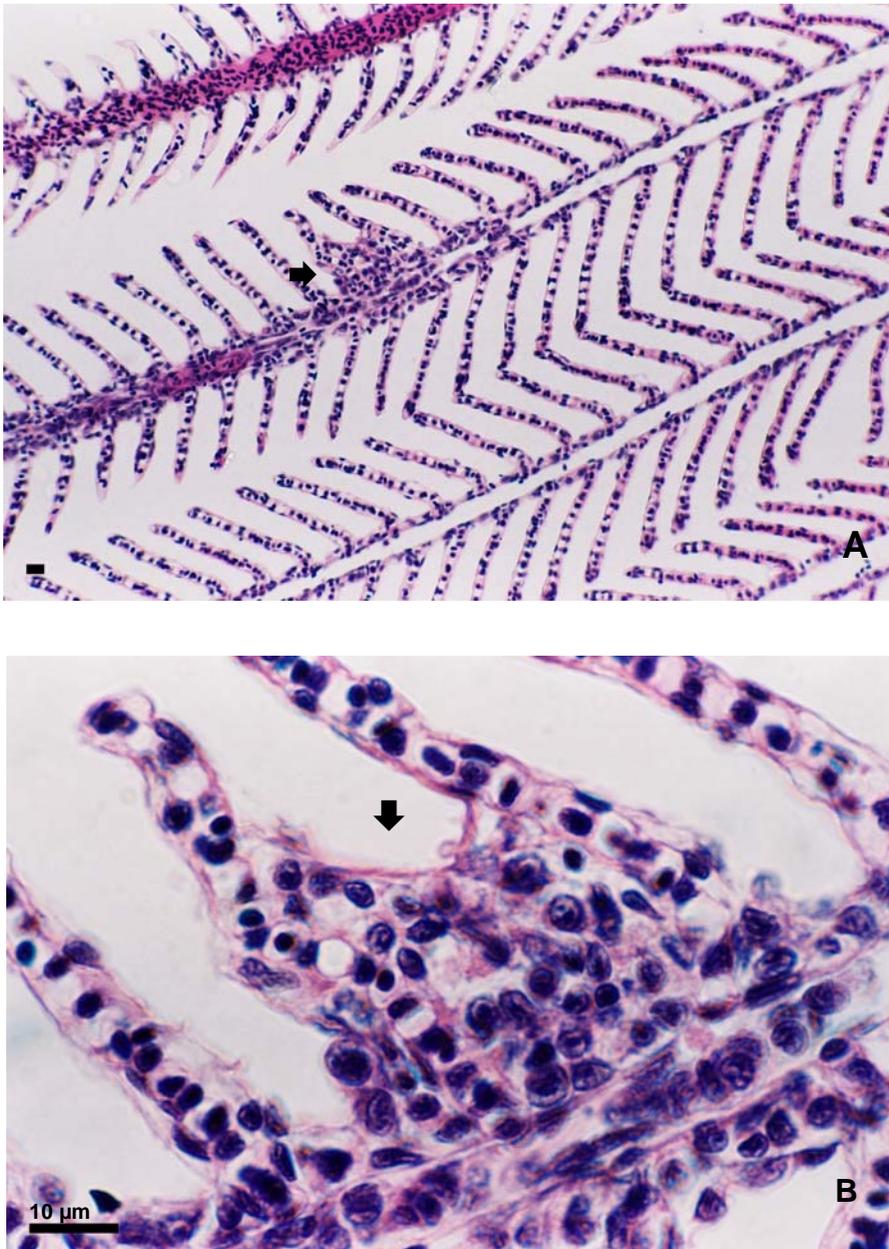


Figura 21 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 96h. **A e B** – Observar: hiperplasia (➔). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

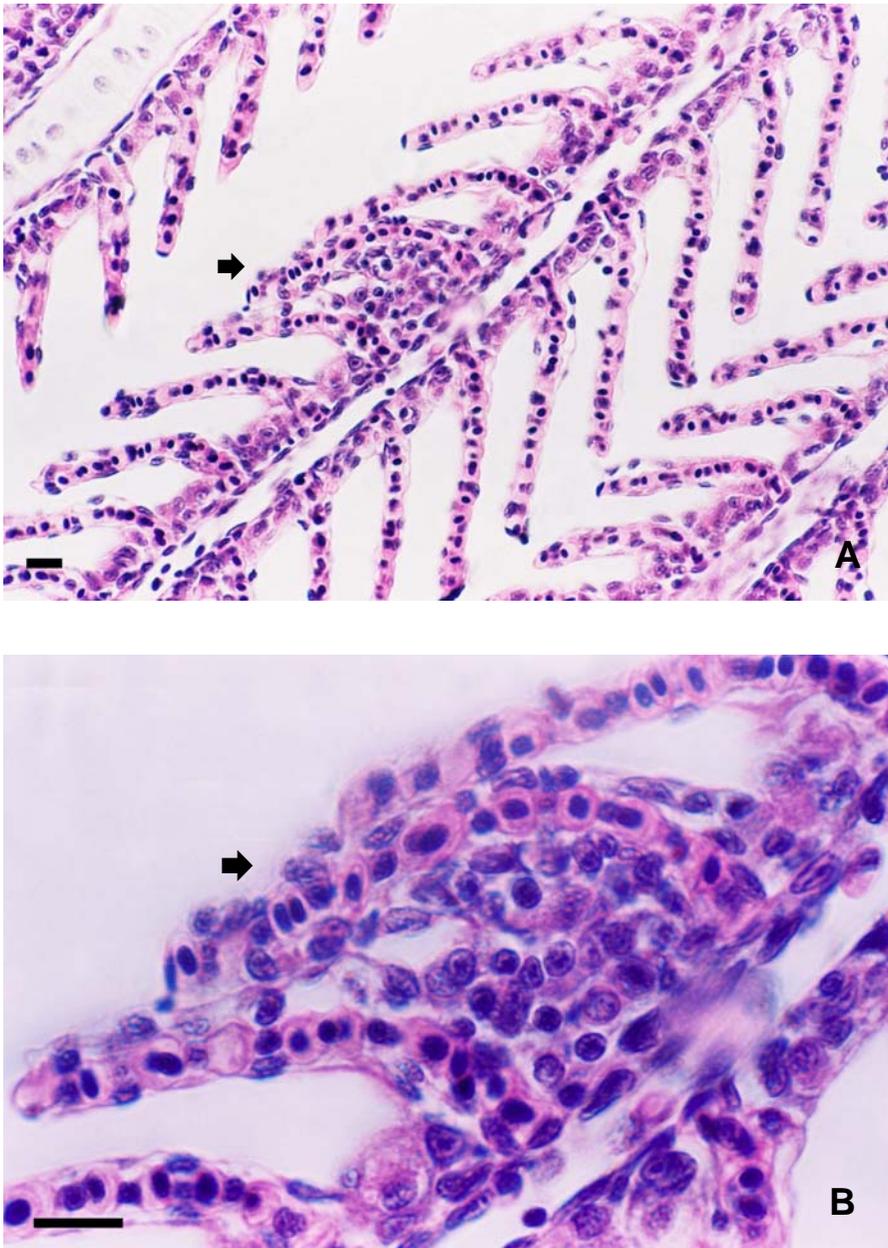


Figura 22 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 - 96h. **A e B** – Observar: hiperplasia e fusão de lamelas secundárias (➔). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

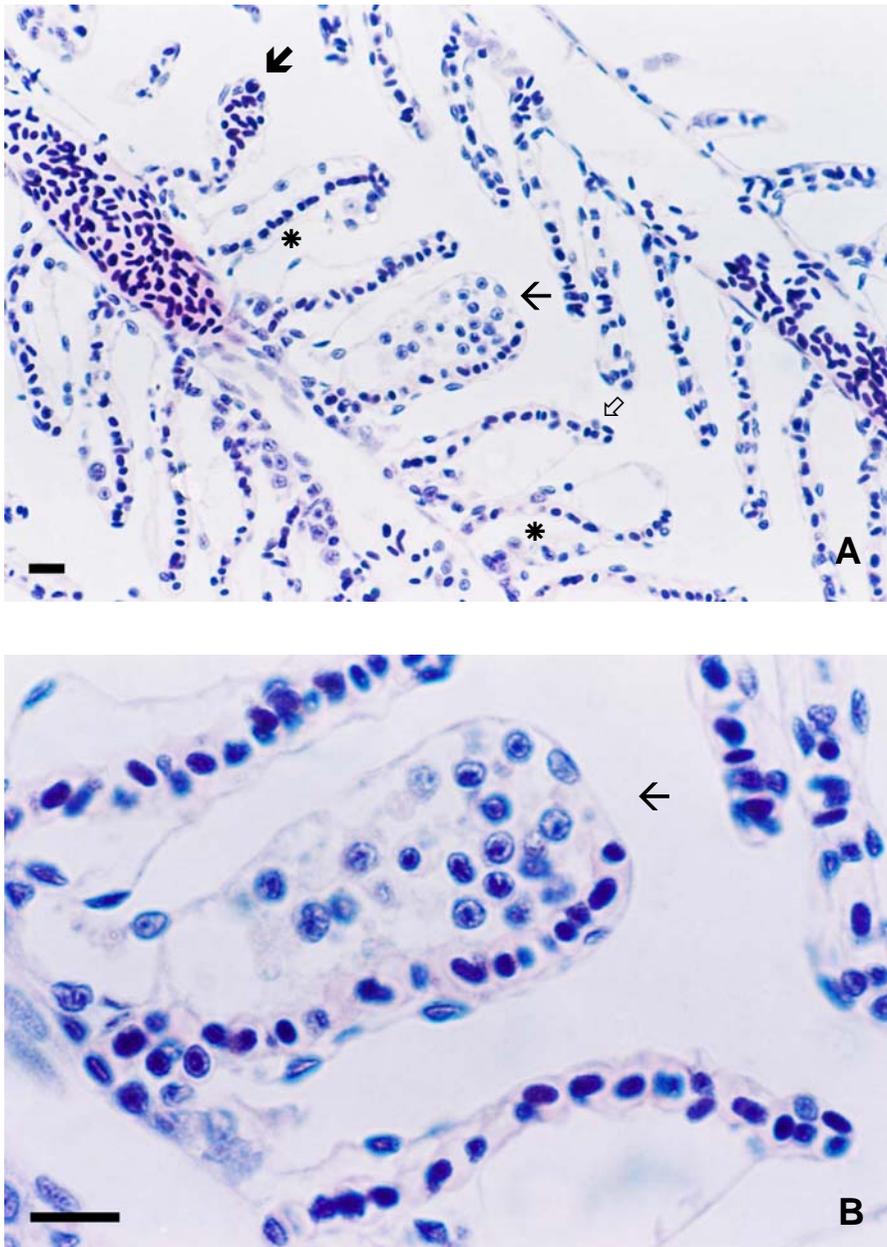


Figura 23 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 96h. **A** – Observar: lamelas secundárias com descolamento intenso (*), lamela secundária com descolamento severo (↗), hiperplasia (←) e aneurisma (↙). **B** – Observar: lamela secundária com hiperplasia (←). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

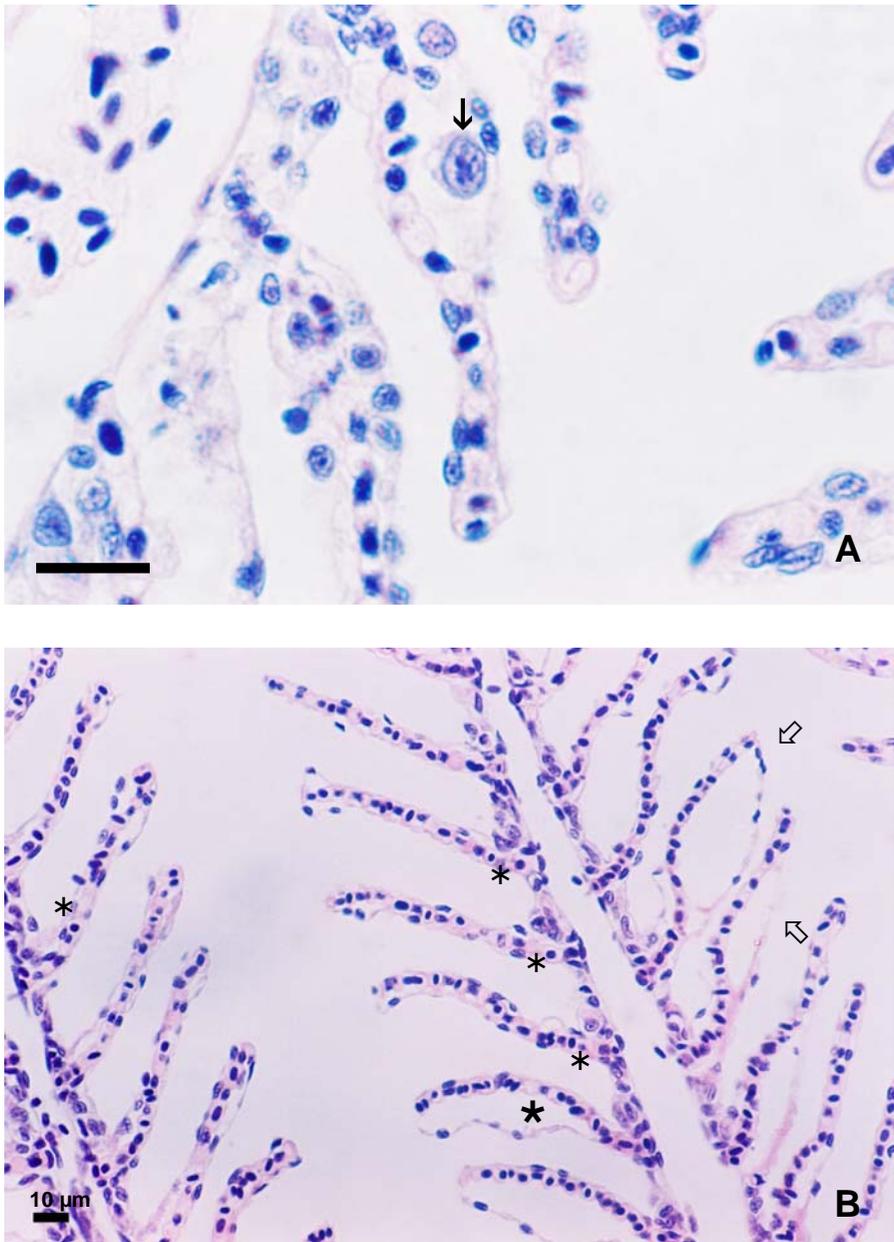


Figura 24 – Organização estrutural das brânquias de *Piarractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 96h. **A** – Observar: núcleo hipertrofiado da célula epitelial (↓). **B** – Observar: lamelas secundárias com descolamento brando (*), lamela secundária com descolamento moderado (*) e lamelas secundárias com descolamento severo (⊞). Escalas A e B: 10 μm. Coloração H.E.

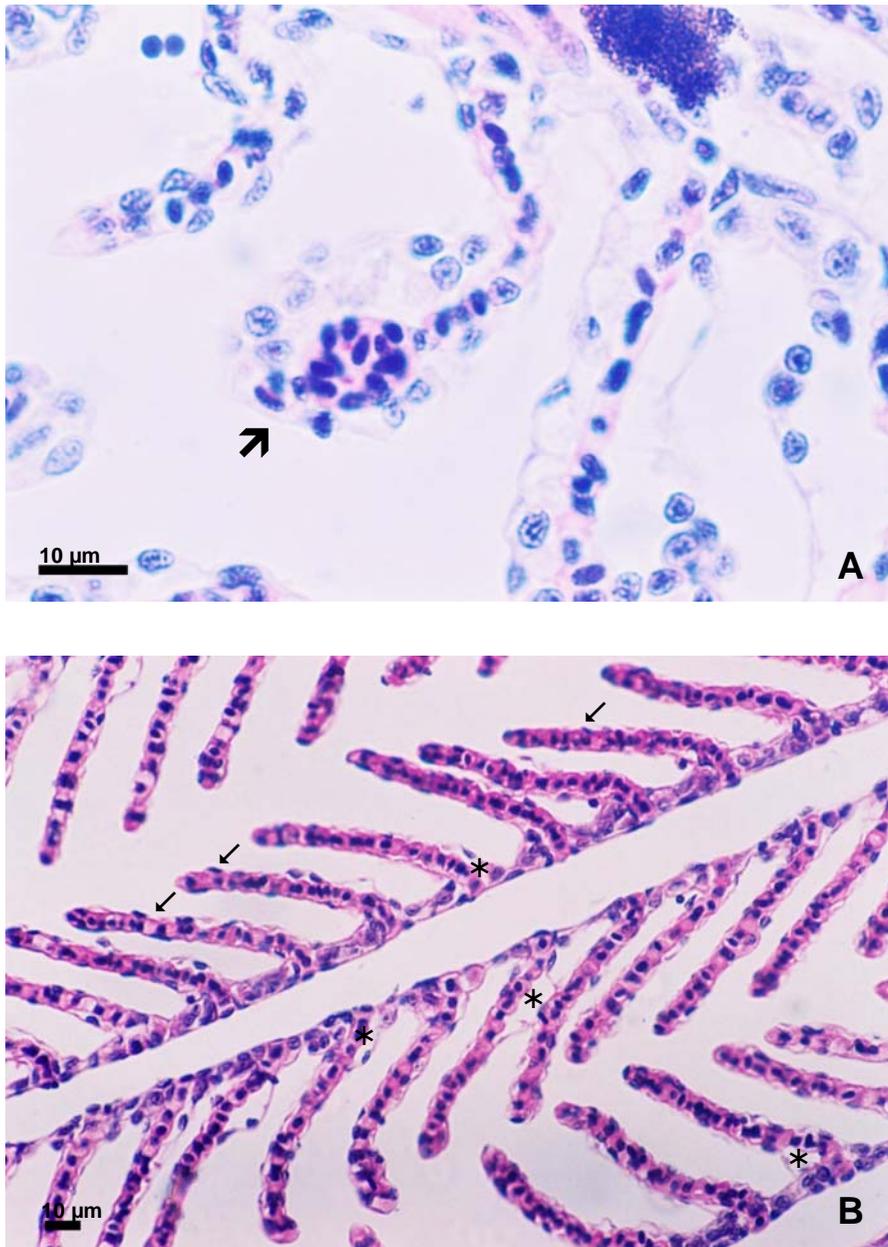


Figura 25 – Organização estrutural das brânquias de *Piaractus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 – 96h. **A** – Observar: aneurisma (↗). **B** – Observar: lamelas secundárias com descolamento mínimo (✓) e lamelas secundárias com descolamento brando (*). Escalas A e B: 10 µm. Coloração H.E.

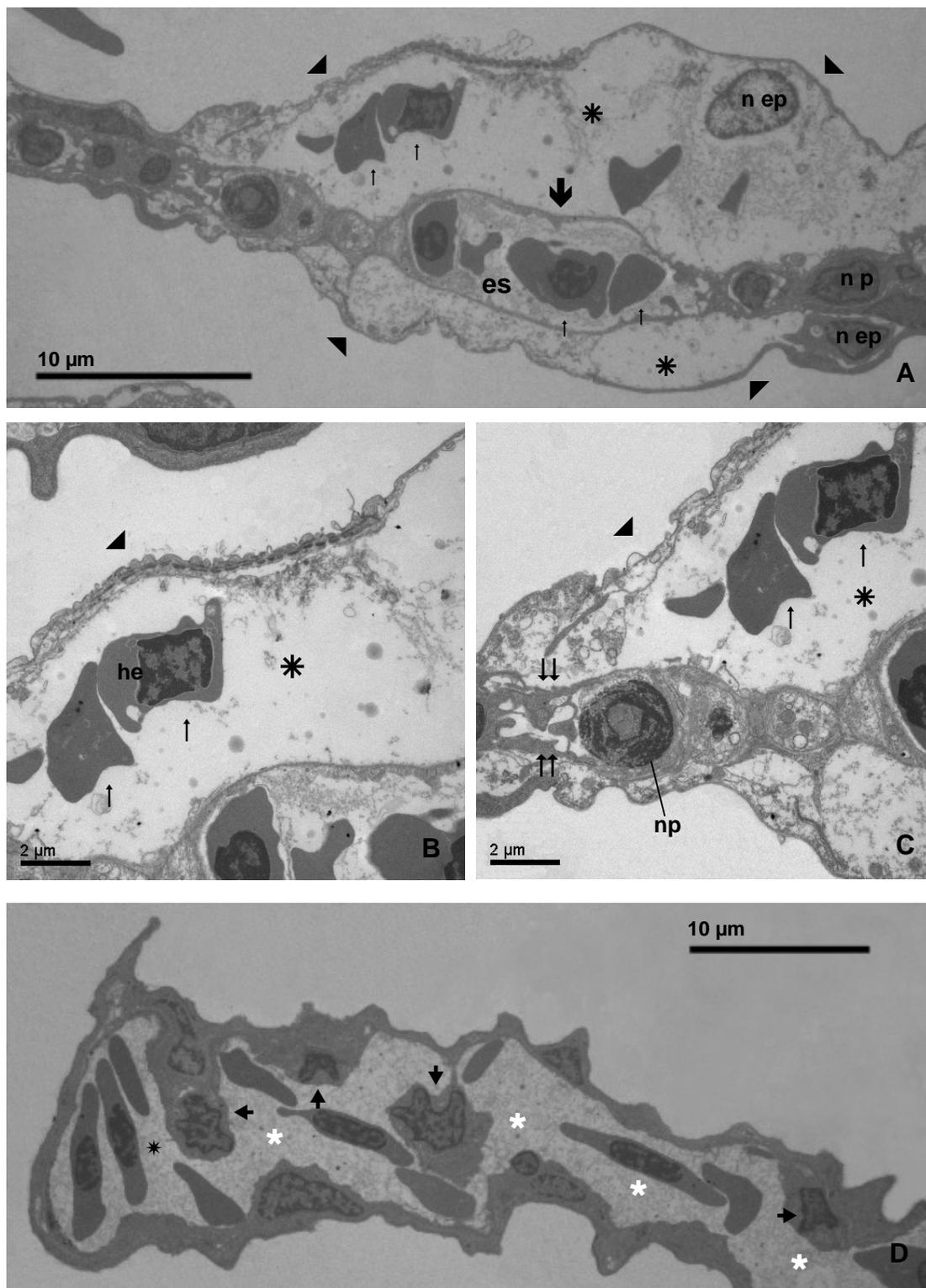


Figura 26 – Organização ultraestrutural das brânquias de *Piactus mesopotamicus* exposto ao organofosforado Azodrin® 400 - 96h. **A, B e C** – Observar: lamela secundária com descolamento do epitélio (▲), edema (*), aneurisma (▼), núcleo da célula epitelial (n ep), espaço sanguíneo (es), núcleo da célula pilar (n p) e hemácias com formato alterado (↑). **D** – Observar: desestruturação do sistema de células pilares (➔), perda do limite dos espaços sanguíneos os quais apresentam-se contínuos (*) e desorganização do capilar sanguíneo marginal (*).

Tabela 2

Quantificação das lesões branquiais em *Piaractus mesopotamicus* durante exposição aguda a 1,08 mg/L do organofosforado Azodrin® 400

	Tempo de Exposição (horas)							
	Controle (n = 10)	1 (n = 6)	4 (n = 6)	12 (n = 5)	24 (n = 5)	48 (n = 6)	72 (n = 5)	96 (n = 6)
Nº Total de Lamelas Secundárias*	199,50 ± 16,03	176,50 ± 12,45	166,33 ± 12,25	185,80 ± 19,39	148,40 ± 13,14	162,00 ± 22,22	141,40 ± 11,23	193,33 ± 8,98
Descolamento Mínimo**	23,06 ± 3,26	± 6,45	40,67 ± 6,62	43,20 ± 8,10	30,60 ± 5,27	14,33 ± 2,32	27,00 ± 9,44	51,83 ± 5,43
Descolamento Brando**	8,87 ± 1,68	6,50 ± 3,21	9,00 ± 2,82	4,60 ± 1,36	9,00 ± 1,79	17,83 ± 2,27	23,60 ± 6,79	21,00 ± 3,24
Descolamento Moderado**	4,71 ± 1,57	4,67 ± 1,36	12,00 ± 4,49	9,60 ± 3,97	21,40 ± 3,23	14,50 ± 3,83	13,00 ± 4,56	18,50 ± 4,21
Descolamento Severo**	8,97 ± 4,16	2,83 ± 1,76	7,83 ± 3,55	8,00 ± 5,94	20,80 ± 6,33	44,17 ± 6,21	22,20 ± 2,87	24,00 ± 8,56
Descolamento Intenso**	2,71 ± 1,64	0,83 ± 0,65	3,33 ± 2,58	3,20 ± 1,66	9,60 ± 3,98	62,00 ± 19,74	21,80 ± 11,11	9,33 ± 2,78
Hiperplasia**	0,20 ± 0,11	0,83 ± 0,83	0,33 ± 0,21	1,40 ± 0,98	4,40 ± 3,44	1,00 ± 1,00	0,80 ± 0,58	2,00 ± 1,29
Fusão**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,20	0,20 ± 0,20	0,17 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,33
Aneurisma**	0,05 ± 0,05	0,17 ± 0,17	0,50 ± 0,22	1,00 ± 0,77	0,20 ± 0,20	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,20	0,83 ± 0,48

Nota: * Valores são média ± erro da média.

** Valores são a proporção da média ± proporção do erro da média em relação ao número total de lamelas secundárias analisadas em cada tempo experimental e no controle.

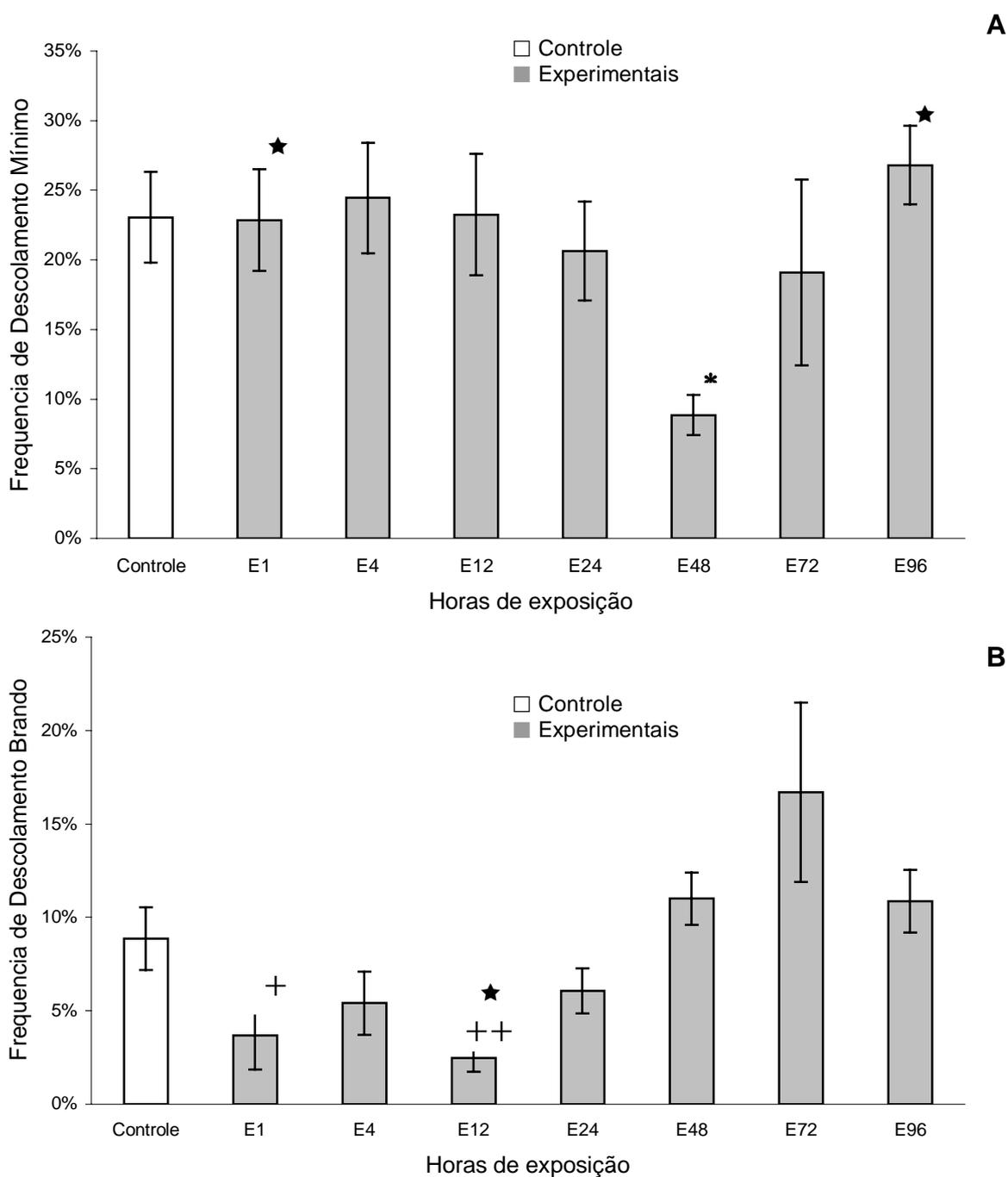


Figura 27 – A – Porcentagem da média de ocorrência de descolamento mínimo nas brânquias de *Piaractus mesopotamicus* nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin® 400. **B** – Porcentagem da média de ocorrência de descolamento brando nas brânquias de *P. mesopotamicus* nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin® 400. Estatística: * = diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. ★ = diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo experimental 48 horas. + = diferença significativa ($p < 0,05$) e ++ = diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo experimental 72 horas. Valores são média \pm SEM em relação ao número total de lamelas secundárias analisadas em cada tempo experimental e no controle.

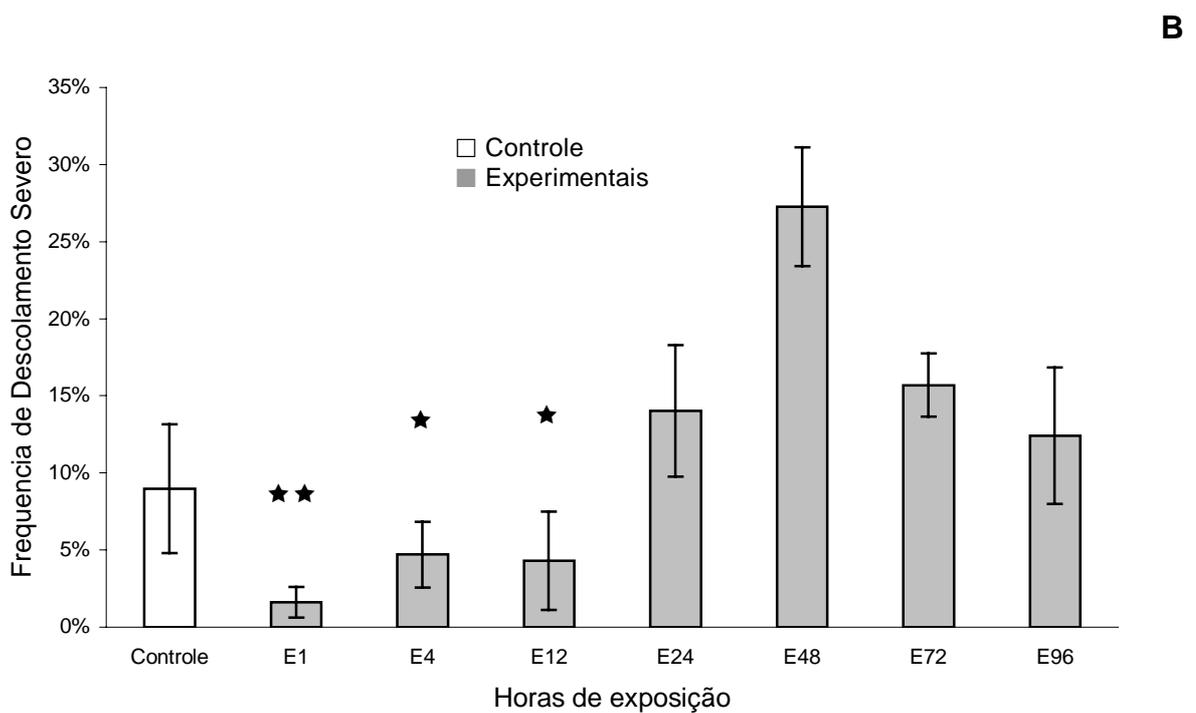
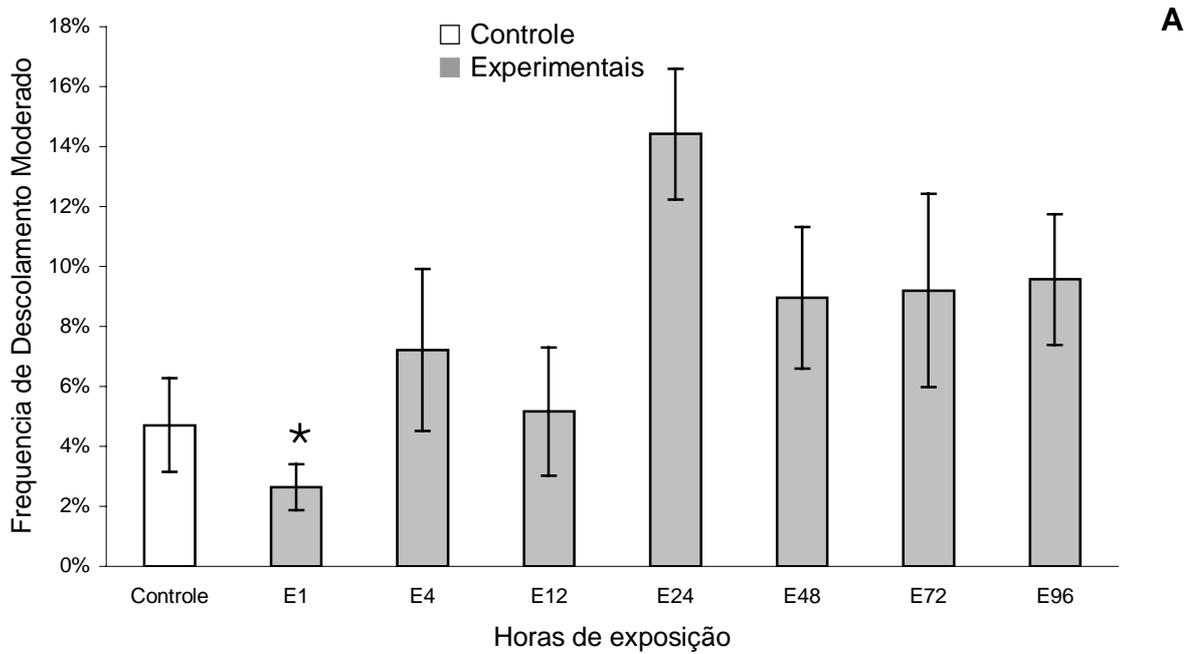
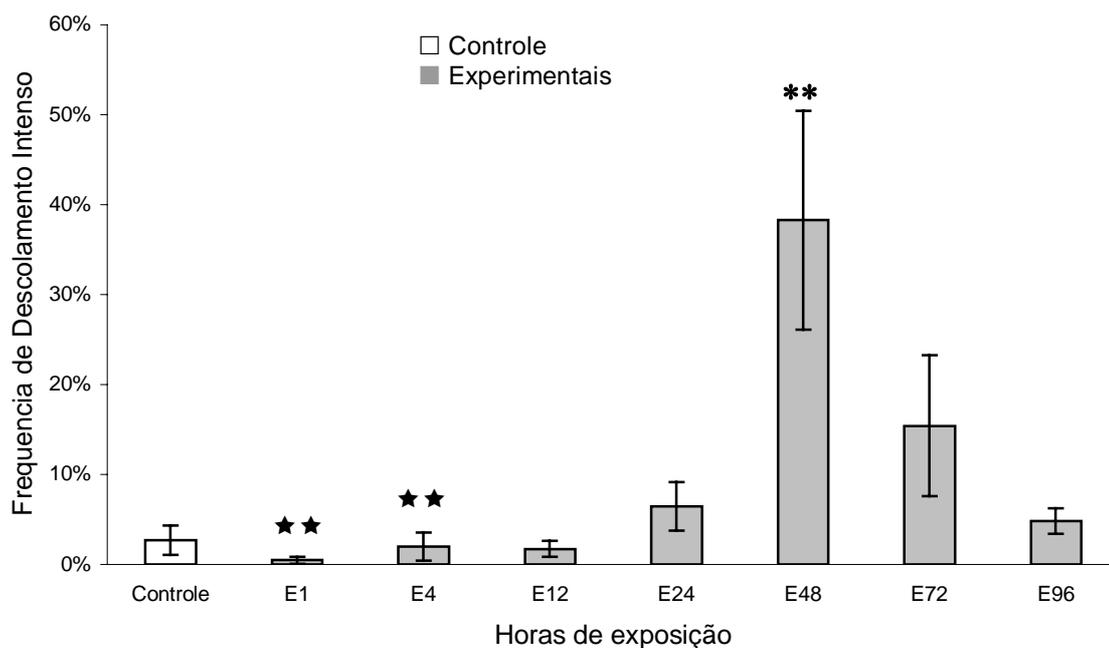


Figura 28 – **A** – Porcentagem de ocorrência de descolamento moderado nas brânquias de *P. mesopotamicus* nos diferentes tempos de exposição. **B** – Porcentagem de ocorrência de descolamento severo nas brânquias de *P. mesopotamicus* nos diferentes tempos de exposição. ★ = diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo 24 horas. ★★ = diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo experimental 48 horas. Valores são média \pm SEM em relação ao número total de lamelas secundárias analisadas em cada tempo experimental e no controle.

A



B

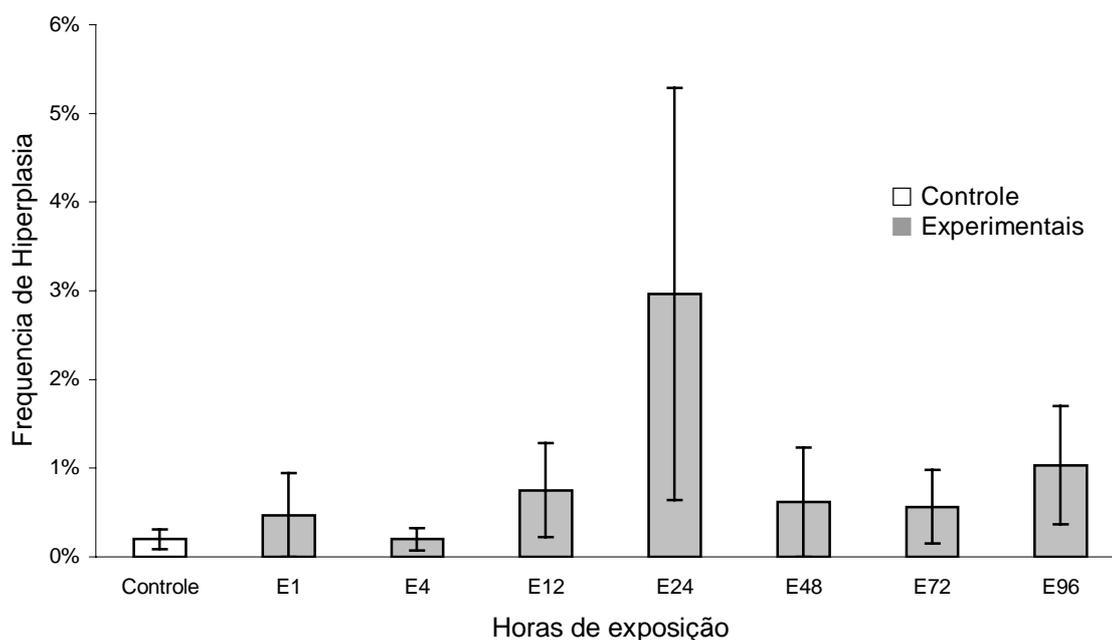


Figura 29 – **A** – Porcentagem da média de ocorrência de descolamento intenso nas brânquias de *P. mesopotamicus* nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin[®] 400. **B** – Porcentagem da média de ocorrência de hiperplasia nas brânquias de *P. mesopotamicus* nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin[®] 400. Estatística: ** = diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle. ★★ = diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo experimental 48 horas. Valores são média \pm SEM em relação ao número total de lamelas secundárias analisadas em cada tempo experimental e no controle.

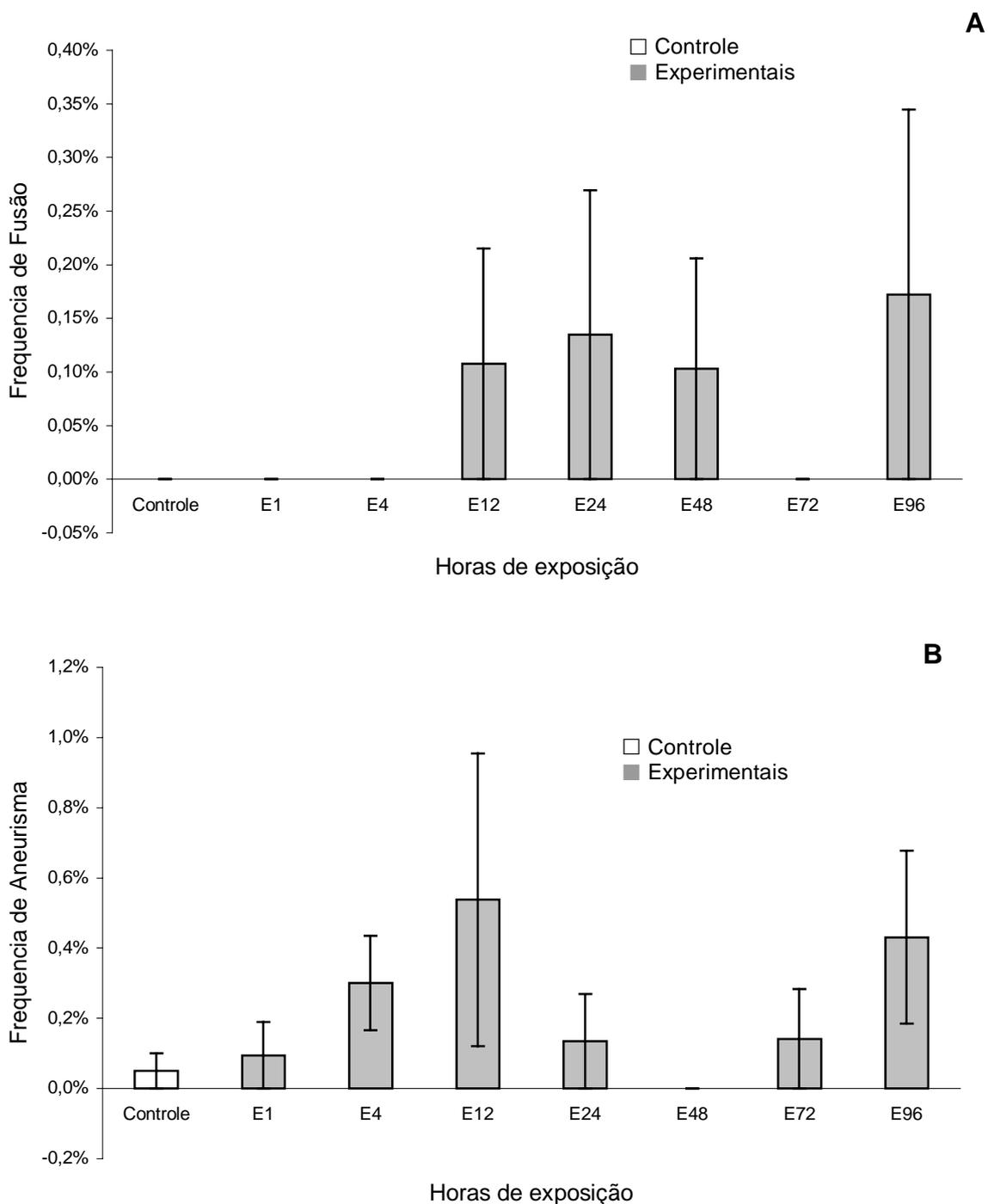


Figura 30 – A – Porcentagem da média de ocorrência de fusão nas brânquias de *Piaractus mesopotamicus* nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin® 400. **B** – Porcentagem da média de ocorrência de aneurisma nas brânquias de *P. mesopotamicus* nos diferentes tempos de exposição ao organofosforado Azodrin® 400. Valores são média \pm SEM em relação ao número total de lamelas secundárias analisadas em cada tempo experimental e no controle.

5. DISCUSSÃO

A obtenção da faixa subletal 1,5 e 0,75 mg/L através de exposição aguda (96 horas), foi um parâmetro importante servindo com base para a escolha da concentração subletal 1,08 mg/L. A utilização de uma concentração subletal baixa (1,08 mg/L) aproxima-se mais da realidade. Isto está relacionado ao fato de que o organofosforado aplicado em lavouras agrícolas, ao entrar em contato com o meio aquático vai se tornando diluído sem, no entanto, deixar de afetar os organismos aquáticos, entre eles os peixes. Segundo SARAVANA BHAVAN e GERALDINE (2000) a exposição de organismos aquáticos, mesmo a níveis muito baixos de pesticidas, resulta em alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas em tecidos vitais. Por esta razão, não foi determinada a CL₅₀ exata do organofosforado Azodrin[®] 400 devido ao objetivo deste trabalho estar relacionado a utilização de uma dose subletal baixa de um agrotóxico em um peixe nativo.

A CL₅₀ em 96h do monocrotofós é bastante variada entre as espécies. Para o peixe *Oreochromis niloticus* a CL₅₀ foi de 4,9 mg/L de monocrotofós (THANGNIPON *et al.*, 1995). No peixe *Anabas testudineus* a CL₅₀ verificada em 96h foi de 19 mg/L (SANTHAKUMAR *et al.*, 1999).

O bioensaio de exposição aguda do peixe *P. mesopotamicus* a 1,08 mg/L do Azodrin[®] 400, por via hídrica, mostrou-se satisfatório para a constatação dos efeitos tóxicos do organofosforado, não sendo observado mortalidade de nenhum peixe durante o experimento.

A histologia revelou ser um ótimo biomarcador na investigação das alterações morfológicas resultantes dos efeitos tóxicos do Azodrin[®] 400. Como um indicador de exposição a contaminantes, a histologia representa um instrumento útil para avaliar o grau de poluição, particularmente para o estudo de efeitos subletais e crônicos (BERNET *et al.*, 1999). Segundo WESTER e CANTON (1991) a histologia é um parâmetro bastante sensível que apresenta resultados confiáveis que podem ser utilizados como base para outros estudos.

As brânquias foram o órgão escolhido para este estudo porque estão em contato direto com o meio aquático, constituindo-se em excelentes indicadores da qualidade da água. Como órgão vital, as brânquias têm função essencial na troca

dos gases respiratórios e regulação do balanço iônico e osmótico (SARAVANA BHAVAN e GERALDINE, 2000). Portanto, as brânquias são o primeiro órgão afetado por poluentes presentes na água, e por serem consideradas órgãos alvos, lesões no tecido branquial afetam as funções fisiológicas do indivíduo como um todo.

A quantificação das lesões feita no presente estudo favoreceu as análises permitindo uma avaliação mais precisa dos danos causados pela concentração de 1,08 mg/L do organofosforado Azodrin[®] 400 para as brânquias de *P. mesopotamicus* e, conseqüentemente, para o organismo do peixe. Segundo BERNET *et al.* (1999) a quantificação das lesões em uma investigação histopatológica, torna a avaliação estatística praticável. Entretanto, ele acrescenta que a descrição morfológica das lesões é essencial e pode ser somada aos métodos de quantificação.

O descolamento epitelial foi a alteração histopatológica mais freqüente, estando presente em todos os tempos de exposição testados e inclusive no controle. O descolamento do epitélio tem estado presente em diversos estudos de exposição aguda envolvendo o tecido epitelial de peixes contaminados com organofosforados como o Malation (RICHMONDS e DUTTA, 1989; CAPINPIN, 1994), o Diazinon (DUTTA *et al.*, 1993) e o Metil Paration (FANTA *et al.*, 2003; MACHADO e FANTA, 2003). A classificação feita neste trabalho dos descolamentos em mínimo, brando, moderado, severo e intenso foi um procedimento considerável. Os resultados obtidos revelaram diferenças significativas na quantificação dos tipos de descolamentos e dos tempos relacionados. Este tipo de classificação não foi observado na literatura consultada e foi considerado bastante qualificado também para estudos futuros deste nível de comparação.

Na revisão de MALLATT (1985) o descolamento do epitélio foi a alteração mais encontrada. Segundo ele esta alteração ocorre com mais freqüência em peixes de água-doce do que em peixes marinhos. MACHADO e FANTA (2003) explicam que os peixes dulcícolas são hiperosmóticos em relação ao ambiente, facilitando o influxo de água através da lesão epitelial, aumentando o volume do edema, e conseqüentemente o descolamento. Tal condição aumenta a distância de difusão através da qual a substância tóxica precisa percorrer para alcançar a corrente sanguínea (RICHMONDS e DUTTA, 1989; THOPHON *et al.*, 2003). O aumento na distância de difusão pode afetar a respiração do peixe, resultando na sua morte (DUTTA *et al.*, 1993).

O descolamento do epitélio é descrito também em estudos envolvendo outros tipos de poluentes ambientais em brânquias de peixes. Para THOPHON *et al.*, (2003) no tecido branquial do peixe *Lates calcarifer* após exposição a 10 mg/L e 0,8 mg/L de cádmio por 96h e 90 dias, respectivamente, o edema apareceu como um primeiro sinal de patologia. O estudo envolvendo o peixe *Oncorhynchus mykiss* contaminado com Diclofenac, um medicamento anti-inflamatório utilizado pelo homem, revelou um descolamento epitelial ocasional (SCHWAIGER *et al.*, 2004). A investigação no tecido branquial do peixe *Solea senegalensis* exposto a concentração subletal de cobre em 96h, mostrou que o descolamento do epitélio foi uma das lesões comuns (ARELLANO *et al.*, 1999). O descolamento do epitélio foi observado também no peixe *Gymnocorymbus ternetzy* após exposição à águas acidificadas (KAWALL, 1993).

Após os tempos iniciais 1h, 4h, 12h e 24h de exposição ao organofosforado Azodrin[®] 400 e depois nos tempos finais 72h e 96h, observou-se um número maior de lamelas secundárias com a alteração descolamento mínimo em relação aos demais tipos de descolamentos, sendo que o número de lamelas secundárias com descolamento intenso foi o menor nestes tempos de exposição exceto nos tempos de 24h e 72h. Verificou-se que a intensidade do descolamento foi gradualmente passando de mínimo, nas primeiras horas, a severo e intenso nos tempos de 48h e 72h de exposição. Este fato sugere que a integridade do tecido epitelial que reveste as lamelas secundárias, ainda está mantida nas primeiras horas de exposição. A diminuição do número de lamelas secundárias com o descolamento mínimo após 48h de exposição, mostrou-se coerente com o aumento do número de lamelas secundárias com descolamento intenso neste tempo experimental. RICHMONDS e DUTTA (1989) também verificaram um maior descolamento do epitélio nas lamelas secundárias do peixe *Lepomis macrochirus* após 48h de exposição ao organofosforado Malation. FANTA *et al.* (2003) também observou uma proporção maior de lamelas secundárias apresentando descolamentos com o aumento do tempo de exposição. Ainda no trabalho de FANTA *et al.* (2003) após 48h de exposição, 74,8% de lamelas secundárias apresentavam descolamento e em 72h esta proporção aumentou para 80,0%.

A diminuição do número de lamelas secundárias com o descolamento intenso após 96h de exposição sugere uma possível recuperação do tecido branquial frente a redução na concentração de Azodrin[®] 400 na água dos aquários experimentais.

Isso está de acordo com o aumento do número de lamelas secundárias com a alteração descolamento mínimo verificado após as 96h. O mesmo foi observado em relação ao número de lamelas secundárias com descolamento brando, o qual foi significativamente maior após 72h de exposição. Também FANTA *et al.* (2003) observou uma reorganização do tecido branquial de *Corydoras paleatus* após 96h de exposição ao organofosforado Folidol® 600.

O total de lamelas secundárias com descolamento brando mostrou-se menor nos tempos iniciais 1h, 4h, 12h e 24h de exposição ao organofosforado, o que também está de acordo com a maior frequência de lamelas secundárias com descolamento mínimo observado nestes tempos experimentais. O número de lamelas secundárias com descolamento moderado foi significativamente menor após 1h de exposição e maior após 24h de exposição. O total de lamelas secundárias com descolamento severo foi menor nos tempos experimentais iniciais 1h, 4h e 12h e apresentou um número maior entre 24h e 96h de exposição.

A hiperplasia das células epiteliais foi mais freqüente em 24h de exposição. Esta alteração ocorre entre as lamelas secundárias e pode levar a fusão entre duas ou mais lamelas secundárias. Segundo MACHADO e FANTA (2003) a proliferação celular entre as lamelas secundárias diminui a área superficial e dificulta as trocas gasosas. A hiperplasia foi também observada em estudos envolvendo brânquias de peixes contaminados com metais como o cobre (KARAN *et al.*, 1998; ARELLANO *et al.*, 1999), o cádmio (THOPHON *et al.*, 2003) e o mercúrio (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 1996; FOLLE, 1997); substâncias como cromato de sódio (TEMMINK *et al.*, 1983), sulfato dodecil de sódio (ROSETY-RODRÍGUEZ *et al.*, 2002), fração solúvel de petróleo (AKAISHI, 2003) e Diclofenac (SCHWAIGER *et al.*, 2004); organofosforados como o Diazinon (DUTTA *et al.*, 1993), o Dimethoato (ANNUNE e AJIKE, 1999), o Paration Metílico (MACHADO e FANTA, 2003) e o Folidol® 600 (FANTA *et al.*, 2003).

A alteração histopatológica fusão de lamelas secundárias foi também observada nas brânquias de *P. mesopotamicus*. A fusão de lamelas secundárias determina uma redução na área respiratória total das brânquias, resultando na diminuição da capacidade de captação do oxigênio pelas brânquias do peixe (OJHA *et al.*, 1989). Fusão de lamelas secundárias foi igualmente observada em brânquias do peixe *Lepomis macrochirus* após 72h de exposição ao Malation (RICHMONDS e DUTTA, 1989). Também, após 72h de exposição ao Malation, foi observada a fusão

nas brânquias do peixe *Oreochromis niloticus* (CAPINPIN, 1994). A fusão foi também verificada em estudos envolvendo peixes contaminados com metais como o mercúrio (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 1996), o cobre (KARAN *et al.*, 1998; ARELLANO *et al.*, 1999), o cádmio (THOPHON *et al.*, 2003).

A alteração aneurisma também verificada nas lamelas secundárias de *P. mesopotamicus*. Para van den HEUVEL *et al.* (2000) os aneurismas no tecido branquial provavelmente resultam da morte das células pilares resultando na perda da integridade estrutural da lamela secundária e acúmulo células sanguíneas. Aneurismas similares têm sido observados no tecido branquial de peixes expostos a contaminantes incluindo fração solúvel de petróleo (AKAISHI, 2003), cádmio (THOPHON *et al.*, 2003) e cobre (KARAN *et al.*, 1998).

As alterações histopatológicas hiperplasia, fusão e aneurisma não apresentaram diferenças significativas tanto em relação ao grupo controle como quando comparadas entre si. Estas lesões foram sempre menores no grupo controle, com exceção do aneurisma, que em 4h foi quantitativamente maior no controle e em 48h não foi verificado. Estes resultados sugerem que a dose subletal utilizada foi baixa causando poucas lesões no tecido branquial de *P. mesopotamicus*.

Algumas alterações estruturais podem servir como um mecanismo para proteger o peixe da água contaminada com o organofosforado pelo aumento da distância de difusão (DUTTA *et al.*, 1993). O descolamento epitelial e a hiperplasia são mecanismos típicos de defesa que tem a função de aumentar a distância de difusão poluente-sangue, determinando prejuízo para as trocas gasosas (DUTTA *et al.*, 1993; KARAN *et al.*, 1998).

O enrugamento do epitélio foi outra alteração verificada nas lamelas secundárias de *P. mesopotamicus*. O enrugamento foi observado em todos os tempos experimentais, sendo que em 48h apresentou-se mais intenso. Esta alteração foi igualmente descrita por KARAN *et al.* (1998) na investigação dos efeitos do cobre sobre o tecido epitelial de *Cyprinus carpio*.

RICHMONDS e DUTTA (1989) relataram a presença de uma alteração histopatológica denominada de protuberância ou lamela claviforme nas brânquias do peixe *Lepomis macrochirus* após 24h e 96h de exposição ao organofosforado Malation. Esta alteração não foi verificada no presente estudo.

A alteração no formato das hemácias observada nas brânquias de *P. mesopotamicus*, através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), também foi verificada no peixe *Metynnis roosevelti*, contaminado com o organofosforado Metil Paration (MACHADO e FANTA, 2003). Esta condição possivelmente reduz a capacidade de transporte de oxigênio e conseqüentemente determina um certo nível de hipoxia para o organismo do peixe (MACHADO e FANTA, 2003).

As células pilares observadas na MET nos tempos de exposição de 48h e 96h apresentaram morfologia alterada e conseqüente desorganização dos espaços sanguíneos. Do mesmo modo THOPHON *et al.* (2003) verificou no tecido branquial de *Lates calcarifer* após 48h de exposição ao cádmio um desarranjo do sistema de células pilares. FANTA *et al.* (2003) observou no tecido branquial de *Corydoras paleatus*, após 4h de exposição ao organofosforado Folidol[®] 600, que os espaços sanguíneos tornaram-se estreitos e as células pilares contraídas e, após 8h de contaminação, verificou que a forma das células pilares estava alterada e os espaços sanguíneos tornaram-se expandidos e irregulares. Segundo FANTA *et al.* (2003), a ampliação dos espaços sanguíneos e a contração das células pilares determinam uma diminuição na circulação sanguínea e nos níveis de oxigenação com conseqüente prejuízo para a saúde do peixe.

Neste estudo, algumas das histopatologias branquiais de *P. mesopotamicus* analisadas na microscopia de luz, não foram evidenciadas na MET. O mesmo ocorreu no trabalho de LACROIX *et al.* (1990) com os peixes *Salmo solar* e *Salvelinus fontinalis* coletados em rios acidificados. A histologia do tecido branquial destes peixes revelou lesões que não foram observadas na MET. Para o autor a extensão das lesões nas brânquias verificadas na microscopia de luz foi localizada e mínima e podem facilmente não ser observadas na MET.

Como observado no presente trabalho com *P. mesopotamicus*, os pesticidas organofosforados podem alterar gravemente órgãos vitais em peixes. Os danos causados por estes poluentes em peixes e em outros organismos aquáticos, afetam não apenas a sobrevivência, mas também a reprodução e o metabolismo geral (SANCHO *et al.*, 1997).

Se 1,08 µm do organofosforado Azodrin[®] 400 é uma concentração muito baixa e produz danos em juvenis de *Piaractus mesopotamicus* é necessário observar um cuidado maior com este produto.

Embora o uso de pesticidas não possa ser evitado, medidas devem ser tomadas para manter a qualidade da água e também para proteger os recursos aquáticos, incluindo os peixes e demais organismos aquáticos utilizados na alimentação (SAMUEL e SASTRY, 1989).

Devido às lesões histopatológicas observadas em *Piaractus mesopotamicus*, após exposição subletal ao Azodrin[®] 400, não serem determinadas exclusivamente por organofosforados, os resultados podem ser utilizados para estudos futuros envolvendo também outros tipos de poluentes.

6. CONCLUSÕES

- *Piaractus mesopotamicus* foi um bom indicador para este estudo.
- A faixa subletal do organofosforado Azodrin[®] 400 para o peixe *Piaractus mesopotamicus* foi entre 1,50 mg/L e 0,75 mg/L.
- O organofosforado Azodrin[®] 400, na concentração subletal de 1,08 mg/L, apresenta baixa toxicidade aguda para os juvenis de *Piaractus mesopotamicus*.
- A morfologia branquial de *Piaractus mesopotamicus* foi alterada pela exposição a 1,08 mg/L do organofosforado Azodrin[®] 400.
- As respostas subletais histopatológicas observadas neste trabalho para a exposição ao Azodrin[®] 400, levam à perda na qualidade de vida dos indivíduos testados.
- Este trabalho demonstrou que a classificação dos descolamentos em mínimo, brando, moderado, severo e intenso pode vir a ser utilizada como um parâmetro a mais nos estudos de toxicidade do tecido branquial.
- A quantificação dos tipos de descolamentos apresentou diferenças significativas nos diferentes tempos experimentais.
- O descolamento mínimo foi menos freqüente em 48 horas de exposição.
- O descolamento intenso foi mais freqüente em 48 horas de exposição.

REFERÊNCIAS

AKAISHI, F. M. **Aplicação de biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo**. Curitiba, 2003. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ANNUNE, P. A.; AJIKE, S. U. Acute toxicity and gill morphology of *Oreochromis niloticus* (Trewavas) exposed to Rogor[®]. **Journal of Aquatic Sciences**, Oxford, v. 14, p. 1-4, 1999.

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

BANAS, W. P.; SPRAGUE, J. B. Absence of acclimation to Parathion by rainbow trout during sublethal exposure. **Water Research**, Oxon, v. 20, n. 10, p. 1229-1232, 1986.

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* L. during Dimethoate exposure. **Food and Chemical Toxicology**, Oxon, v. 33, n. 5, p. 423-426, 1995.

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

BRANCO, S. M. **O meio ambiente em debate**. 29. ed. São Paulo: Moderna, 1998. 96 p.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do pantanal**: manual de identificação. Brasília: Embrapa, 1999. 184 p.

CAPINPIN, E. C. Gill lesions in Nile tilapia *Oreochromis fingerlings* associated with acute Malathion poisoning. **Philippine Journal of Science**, Manila, v. 123, n. 4, p. 283-291, 1994.

CAVERO, E. S. **Inseticidas e acaricidas**: Toxicologia; Receituário agrônômico. 2. ed. Piracicaba: Livroceres, 1982. 424 p.

CEBRIÁN, C.; ANDREU-MOLINER, E. S.; FERNÁNDEZ-CASALDERREY, A.; FERRANDO, M. D. Acute toxicity and oxygen consumption in the gills of *Procambarus clarkii* in relation to Chlorpyrifos exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 49, 145-149, 1992.

CHEN, W.; MULCHANDANI, A. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. **Trends in Biotechnology**, New York, v. 16, p. 71-75, 1998.

CHEREMISINOFF, N. P.; KING, J. A. **Toxic properties of pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1994. 330 p.

CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. **Cellular pathology technique**. 4. ed. London: Butterworth, 1985. 642 p.

DESAI, A. K.; JOSHI, U. M.; AMBADKAR, P. M. Histological observations on the liver of *Tilapia mossambic* after exposure to Monocrotophos, an organophosphorus insecticide. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 21, p. 325-331, 1984.

DE SILVA, P. M. C. S.; SAMAYAWARDHENA, L. A. Low concentrations of lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 53, p. 248-254, 2002. Environmental Research, section B.

DUTTA, H. M.; RICHMONDS, C. R.; ZENO, T. Effects of Diazinon on the bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. **Journal of Environmental Phatology**, New York, v. 12, n. 4, p. 219-227, 1993.

DUTTA, H. M.; MUNSHI, J. S.; ROY, P. K.; SINGH, N. K.; ADHIKARI, S. KILLIUS, J. Ultrastructural changes in the respiratory lamellae of the catfish, *Heteropneustes fossilis* after sublethal exposure to malathion. **Environmental Pollution**, Oxon, v. 92, n. 3, p. 329-341, 1996.

DUTTA, H. M.; MAXWELL, L. B. Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, *Lepomis macrochirus*. **Environmental Pollution**, Oxon, v. 121, p. 95-102, 2003.

DUTTA, H. M.; MEIJER, H. J. M. Sublethal effects of diazinon on the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. **Environmental Pollution**, Oxon, v. 125, p. 355-360, 2003.

FANTA, E. Influence of background color on the behavior of the fish *Oreochromus niloticus* (Cichilidae). **Arquivos Biologia e Tecnologia (Curitiba)**, v. 38, p. 1237-1251, 1995.

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

FELLENBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo: EPU, 1980. 196 p.

FERGUSON, H. W. **Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleostes**. 3. ed. Iowa: University Press, 1995. 263 p.

FOLLE, N. M. T. **Histopatologia dos efeitos da interação de mercúrio inorgânico e água acidificada em níveis subletais no peixe *Metynnis roosevelti* (Eigenmann, 1915)** Curitiba, 1997. 103 f. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

GELMINI, G. A.; NOVO, J. P. S.; ZAMARIOLLI, D. P. **Coletânea de portaria e informações gerais sobre defensivos agrícolas e receituário econômico**. Campinas: CATI, 1986. p. 221.

GOLDSTEIN, L. Gill nitrogen excretion. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge: Cambridge University, 1982. p. 25-43.

GOSS, G. G.; LAURENT, P.; PERRY, S. F. Gill morphology during hypercapnia in brow bulhead (*Ictalurus nebulosus*): role of choride cells and pavement cells in acid-base regulation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 705-718, 1994.

HAGAR, H. H.; FAHMY, A. H. A biochemical, histochemical, and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas. **Toxicology Letters (Shannon)**, v. 133, p. 161-170, 2002.

HARTL, M. G. J.; HUTCHINSON, S.; HAWKINS, L. E.; ELEDJAM, M. The biometry of gills of 0-group European flounder. **Journal of Fish Biology**, London, v. 57, p. 1037-1046, 2000.

HINTON, D. E.; LAUREN, D. J. *In vivo* microscopy of liver microvasculature in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). **Marine Environmental Research**, Oxon, v. 28, p. 407-410, 1989.

JOHANSEN, K. Respiratory gas exchange of vertebrate gills. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge: Cambridge University, 1982. p. 25-43.

JOKANOVIC, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, Oxon, v. 166, n. 3, 2001.

KARAN, V.; VITOROVIC, S.; TUTUNDZIC, V.; POLEKSIC, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after cooper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 40, p. 49-55, 1998.

KAWALL, H. G. **Efeitos de águas ácidas em *Gymnocorymbus ternetzy* (Boulenger, 1895) (pisces: Characidae)**. Curitiba, 1993. 111 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

KOH, D.; JEYARATNAM, J. Pesticides hazards in developing countries. **The Science of the Total Environment**, Shannon, v. 188, suppl. 1, S78-S85, 1996.

LACROIX, G. L.; HOOD, D. J.; BELFRY, C. S.; RAND, T. G. Plasma electrolytes, gill aluminum content, and gill morphology of juvenile Atlantic salmon (*Salmo solar*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) indigenous to acidie streams of Nova Scotia. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 68, p. 1270-1280, 1990.

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

LAURENT, P. Struture of vertebrate gills. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge: Cambridge University, 1982. p. 25-61.

LIMA, J. A. F.; OLIVEIRA, B.; CONLON, M. Purification and characterization of insulin and peptides derived from proglucagon and prosomatostatin from fruit-eating fish, the pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Oxford, v. 122, p. 127-135, 1998.

LU, F. C. **Basic toxicology**: fundamentals, target organs, and risk assessment. 3. ed. Washington: Taylor & Francis, 1996. p. 277-291.

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

MACHADO, M. R. **Efeitos do organofosforado Paration Metílico na morfologia e ultraestrutura branquial do Pacu *Metynnis roosevelti* Eigenmann, 1915, e suas implicações toxicológicas**. Curitiba, 1995. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MALLATT, J. Gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 42, p. 630-648, 1985.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas: defensivos**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1980. v. 1, 305 p.

MELLANBY, K. **Biologia da poluição**. 2. ed. São Paulo: EPU, 1980. p. 89

MOTA, S. **Planejamento urbano e preservação ambiental**. Fortaleza: UFC, 1981. 241 p.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 599 p.

NEMR, A. E.; ABD-ALLAH, A. M. A. Organochlorine contamination in some marketable fish in Egypt. **Chemosphere**, Oxon, v. 54, p. 1401-1406, 2004.

OHKAWA, H.; OSHITA, H.; MIYAMOTO, J. Comparison of inhibitory activity of various organophosphorus compounds against acetylcholinesterase and neurotoxic esterase of hens with respect to delayed neurotoxicity. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 29, p. 2721-2727, 1980.

OJHA, J.; ROOJ, N. C.; MITTAL, A. K.; MUNSHI DATTA, J. S. Lightm and scanning electrn microscopic studies on the effect of biocidal plant sap on the gills of a hill stream fish, *Garra lanta* (Ham.). **Journal of Fish Biology**, London, v. 34, 165-170, 1989.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FANTA, E.; TURCATTI, N. M.; CARDOSO, R. J.; CARVALHO, C. S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). **Biocell**, Mendoza, v. 20, n. 3, p. 171-178, 1996.

PEHKONEN, S. O.; ZHANG, Q. The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 32, n. 1, p. 17-72, 2002.

PIIPER, J.; SHEID, P. Physical principles of respiratory gas exchange in fish gills. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. New York: Cambridge University Press, 1982. p. 45-61.

PROJETO PACU. **Informações sobre o pacu**. Disponível em <<http://www.projetopacu.com.br.html>> Acesso em: 25 mar. 2003.

PUGA, F. R.; MELLO, D. Aspectos toxicológicos de pesticidas. In: NETO, F. G. **Uso de agrotóxicos e receituário agrônomo**. São Paulo: Agroedições, 1982. p. 37-61.

RAMOS, G. E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 6. ed. São Paulo: Andrei, 1999. p. 86-87.

RANDALL, D.; BURGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 569-567.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron – opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-478, 1963.

RICHMONDS, C. R.; DUTTA, H. M. Histopathological changes induced by malathion in the gills of buegill *Lepomis macrochirus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology and Toxicology**, New York, v. 43, p. 123-130, 1989.

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

ROBERTIS, R. J. **Patología de los peces**. Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366 p.

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

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F. J.; ROSETY, M.; ROSETY, J. M.; ROSETY, I.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho-histochemical changes in the

gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., Induced by sodium dodecyl sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 51, p. 223-228, 2002.

SALEHA BANU, B.; DANADEVI, K.; RAHMAN, M. F.; AHUJA, Y. R.; KAISER, J. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, Oxon, v. 39, n. 4, abr. 2001.

SAMUEL, M.; SASTRY, K. V. *In vivo* effect of monocrotophos on the carbohydrate metabolism of the freshwater snake head fish, *Channa punctatus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Orlando, v. 34, p. 1-8, 1989.

SAMPAIO, D. P. A.; GUERRA, M. S. **Receituário agrônômico**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. p. 229-263.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; GAMON, M.; ANDREU-MOLINER, E. Organophosphorus diazinon induced toxicity in the fish *Anguilla anguilla* L. **Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology and Toxicology**, New York, v. 103 C, n. 2, 351-356, 1992.

SANCHO, E.; FERRANDO, M. D.; ANDEU, E. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 36, 57-65, 1997.

SANTHAKUMAR, M.; BALAJI, M.; RAMUDU, K. Effect of sublethal concentrations of monocrotophos on erythropoietic activity and certain hematological parameters of fish *Anabas testudineus* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 63, p. 379-384, jul. 1999.

SANTOS, R. V. A racionalidade dos agrotóxicos e seus efeitos deletérios à saúde. **Caderno Informativo de Prevenção de Acidentes**, São Paulo, n. 200, p. 59-65, 1996.

SARAVANA BHAVAN, P.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcomsonii* exposed to endosulfan. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 50, p. 331-339, 2000.

SCHWAIGER, J.; FERLING, H.; MALLOW, U.; WINTERMAYR, H.; NEGELE, R. D.; Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 68, p. 141-150, 2004.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ – SEAB. Disponível em: < [http:// www.pr.gov.br/agrotoxico/](http://www.pr.gov.br/agrotoxico/)> Acesso em: 10 ago. 2002.

SEVERI, W.; RANTIN, F. T.; FERNANDES, M. N. Respiratory gill surface of the serrasalmid fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 50, p. 127-136, jul. 1996.

SHAO-NAN, L.; DE-FANG, F. Correlation between biochemical parameters and susceptibility of freshwater fish to malathion. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, London, v. 48, p. 413-418, 1996.

SILVA, H. C. **Efeitos subletais do Folidol® 600 em *Callichthys callichthys* (Linnaeus, 1758) (Pisces, Teleostei)**. Curitiba, 1989. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

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

SOGORB, M. A., VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters (Shannon)**, v. 128, p. 215-228, 2002.

STEWART, M. **Animal physiology**. London: Open University, 1991.

STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M. FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, Oxon, v. 55, p. 137-159, 2003.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **Fish histology**. normal and Pathological Features. Tokyo: Kodansha, 1995.

TEMMINK, J. H. M.; BOUWMEISTER, P. DE JONG; VAN DEN BERG, J. H. J. An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquatic Toxicology**, New York, v. 4, p.165-179, 1983.

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

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P. SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, Oxon, v. 121, p. 307-320, 2003.

TSUDA, T.; AOKI, S.; KOJIMA, M.; HARADA, H. Bioconcentration and excretion of diazinon, IBP, malathion and fenitrothion by carp. **Comparative Biochemistry Physiology C Comparative Pharmacology and Toxicology**, Oxford, v. 96C, n. 1, p. 23-26, 1990.

TSUDA, T.; AOKI, S.; INOUE, T.; KOJIMA, M. Accumulation and excretion of diazinon, fenthion and fenitrothion by killfish: comparison of individual and mixed pesticides. **Water Research**, Oxon, v. 29, n. 2, p. 455-458, 1995.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. **Toxicology Letters (Shannon)**, v. 102-103, p. 649-652, 1998.

van den HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J. MacKINNON, M.; DIXON, D. G. Disease and gill lesions in Yellow Perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-Associated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v. 46, p. 334-341, 2000.

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

WESTER, P. W.; CANTON, J. H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry Physiology C Comparative Pharmacology and Toxicology**, Oxford, v. 100C, n. 2, p. 115-117, 1991.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 449-462, 2001.

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

ANEXOS

**PROTOCOLOS DE MICROSCOPIA DE LUZ
PROTOCOLOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO
ANÁLISES ESTATÍSTICAS
BULA DO ORGANOFOSFORADO AZODRIN® 400**

SOLUÇÕES FIXADORAS E CORANTES PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Fixador Alfac

Volume da solução: 100 mL

85 mL de álcool 80%

10 mL de formol 40%

5 mL de ácido acético glacial (a ser adicionado minutos antes da fixação devido a ser volátil)

Processamento histológico para Microscopia de Luz

Etapa	Tempo
1. Fixação em Alfac	16 h
2. Lavagens sucessivas em álcool 70%	-
3. Desidratação em:	
Álcool 80%	20 min
Álcool 80%	20 min
Álcool 80%	20 min
Álcool 90%	20 min
Álcool 90%	20 min
Álcool 90%	20 min
Álcool 100%	20 min
Álcool 100%	20 min
Álcool 100%	20 min
4. Diafanização em:	
Xilol P. A. I	20 min
Xilol P. A. II	15 min
5. Impregnação na estufa a 60 °C com:	
Paralast I	1h e 30 min
Paraplast II	1h e 30 min
6. Emblocagem: em moldes cúbicos de papel com Paraplast solidificado a temperatura ambiente.	-
7. Trimagem: dos blocos em forma de pirâmide e seccionados (cortes de 5 µm).	-
8. Microtomia: cortes de 5 µm	-
9. Montagem das lâminas: feita com os cortes obtidos na microtomia, através da aderência com Albumina 1 %, sendo os cortes esticados na placa aquecedora e secos em temperatura ambiente.	-

Albumina 1%

1 parte clara de ovo

1 parte de glicerina

Alguns cristais de timol

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

Hematoxilina

1 g de hematoxilina

20 g de alúmen de potássio

0,5 g de óxido de mercúrio amarelo

10 mL de álcool 95%

200 mL de água destilada

5 mL de ácido acético glacial

Preparo: Aquecer a água destilada, retirar do fogo e misturar o alúmen de potássio. Deixar overnight. Dissolver a hematoxilina no álcool 95%. Misturar as duas soluções. Adicionar o óxido de mercúrio.

Deixar ferver por 5 minutos. Dar um choque térmico, colocando para esfriar em água corrente. Filtrar. Adicionar o ácido acético glacial no momento do uso.

Eosina

Solução estoque eosina 1%:

1 g de eosina

20 mL de água destilada

80 mL de álcool 95% PA

Preparo: Mistura e obter solução homogênea.

Eosina útil:

1 parte de eosina 1% (solução estoque)

3 partes de álcool 80% PA

0,5 mL de ácido acético glacial (a ser adicionado minutos antes da fixação devido a ser volátil) a cada 95 mL de solução de eosina para uso.

Roteiro para coloração em Microscopia de Luz

Hematoxilina e eosina (HE)

- 1) Desparafinizar com dois banhos de xilol, por 3 minutos cada.
- 2) Hidratar em série decrescente e gradual de álcoois 90% e 70%, por 3 minutos cada.
- 3) Lavar em água corrente e a seguir em água destilada.
- 4) Corar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
- 5) Lavar em água corrente e a seguir em água destilada.
- 6) Contra-corar com Eosina por 1 minuto.
- 7) Lavar em água corrente e a seguir em água destilada.
- 8) Desidratar em série crescente e gradual de álcoois 95%, 100% I e 100% II, por 3 minutos cada.
- 9) Diafanizar em álcool 100% e xilol (1:1) por 3 minutos.
- 10) Diafanizar em dois banhos de xilol por 3 minutos cada.
- 11) Montar as lâminas permanentes com resina Polymount.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

FIXADOR KARNOVSKY

Solução Final:

Paraformaldeído 2%

Glutaraldeído 2,5%

Tampão Cacodilato 0,2M pH 7,2

- **Preparo do paraformaldeído 4%:**

1g de paraformaldeído

25 mL de água destilada

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

- **Preparo do Glutaraldeído 10%:**

2,5 mL de glutaraldeído

10 mL de água destilada

- Esta solução pode ser mantida em estoque na geladeira

- **Preparo do Tampão Cacodilato 0,8M:**

1,6 g de cacodilato
12,85 mL água destilada

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

- **Preparo do Karnovsky**

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

Para 50 mL de Karnovsky:

25 mL de paraformaldeído 2%
12,5 mL de glutaraldeído 10%
12,5 mL de tampão Cacodilato 0,8M pH 7,2

PREPARO DO TAMPÃO CACODILATO 0,2 M

PESO MOLECULAR 214

PM 214,02 g -----1000 mL ----- 1M
x g ----- 50 mL ----- 1M

10,7 g ----- 50 mL ----- 1M
x g ----- 50 mL ----- 0,2 M
x g = 2,14 g

2,14 g de cacodilato
50 mL de água destilada

PREPARO DO TAMPÃO CACODILATO 0,4 M

PESO MOLECULAR 214

PM 214,02 g -----1000 mL ----- 1M
x g ----- 50 mL ----- 1M

10,7 g ----- 50 mL ----- 1M
x g ----- 50 mL ----- 0,4 M
x g = 4,28 g

2,14 g de cacodilato
50 mL de água destilada

PREPARO DO TETRÓXIDO DE ÓSMIO A 2%:

- **Preparo do OsO₄ a 4%:**

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

- **Preparo do OsO₄ a 2%:**

Dilui-se o OsO_4 a 4% em Tampão Cacodilato 0,4 M na mesma proporção (1:1)

PREPARO DA RESINA EPON

Quantidade: 100 mL

Solução A:

15,3 mL EMBED 812

24,7 mL DDSA

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

Solução B:

31,74 mL EMBED 812

24,7 mL NMA

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

SOLUÇÃO ÚTIL

10 mL de solução A

15 mL de solução B

0,25 mL (ou 10 a 15 gotas) DMP – 30

- Conservar o DMP – 30 em geladeira, porém utiliza-lo em temperatura ambiente.
- Deve-se tirar a Epon pura da geladeira 1,5 a 3 horas antes do uso e antes da utilização agitar (manualmente) por 10 minutos.

PREPARO DA URANILA AQUOSA 2% (WATSON, 1958)

2 g de uranila

100 mL de água destilada

Preparo:

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

SOLUÇÃO DE REYNOLDS (REYNOLDS, 1963)

1,30 g Nitrato de chumbo

1,75 g Citrato de sódio

8,00 mL Hidróxido de sódio 1 N

50,00 mL Água destilada

Preparo:

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

AZUL DE TOLUIDINA A 1%

Quantidade: 50 mL

0,5 g de Azul de Toluidina

50 mL de água destilada

Processamento histológico para Microscopia Eletrônica de Transmissão

PROCESSO	TEMPO
Fixação em Karnovsky	4 horas
Lavagem em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2	-
Retirada do tampão cacodilato– pós-fixação com ósmio 2%	1 hora (ou até as peças ficarem pretas)
Lavagem em tampão cacodilato 0,2 M, pH 7,2	-
Lavagem em água destilada 2 vezes	-
Contrastação em bloco de uranila aquosa 2%	2 horas
Lavagem em água destilada	-
Álcool 50% (2 vezes)	5 minutos (cada)
Álcool 70% (2 vezes)	5 minutos (cada)
Álcool 95% (2 vezes)	10 minutos (cada)
Álcool 100% (3 vezes)	10 minutos (cada)
Álcool 100% + Acetona (1:1) (1 vez)	10 minutos
Acetona PA (2 vezes)	15 minutos (cada)
(Preparar a resina para o próximo passo)	
Acetona + Resina (1: 1)	1 hora e 30 minutos
Resina pura	(overnight)
Montagem	
Polimerizar em estufa 60° C	24 horas

ANÁLISES ESTATÍSTICAS REALIZADAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COM O PROGRAMA STATGRAPHICS® v. 5.0

A primeira questão a ser discutida é verificar se as proporções dos peixes controles e dos peixes submetidos aos tratamentos (diferentes tempos) são diferentes. Para isto, foi utilizada a análise de variância.

Variável: número de lamelas secundárias (LS) com descolamento mínimo

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Fonte De Variação	G.L.	Soma Quadrados	De Quadrado Médio	F	P-Valor
Tratamentos	7	0.1198	0.01711	2.537	0,0289
Resíduo	41	0.2766	0.006746		
Total	47	0.3964			

Por esta análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H0, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento e no controle diferem entre si

Verificando os pressupostos da Anova:

A) Homocedasticidade:

A homocedasticidade é avaliada pelo teste de Bartlett onde tem-se a estatística do teste = 8,378 com p-valor de 0,3005.

Hipóteses testadas:

H0: existe homocedasticidade entre os tratamentos.

H1: não existe homocedasticidade entre os tratamentos.

Com este p-valor não rejeitamos H0, ou seja, existe homocedasticidade entre os tratamentos considerando um nível de significância de 5%.

B) Normalidade dos resíduos:

A normalidade dos resíduos é avaliada através do teste de Shapiro-Wilks onde obtém-se a estatística do teste = 0.9588 com p-valor de 0,1533

Hipóteses testadas:

H0: existe normalidade entre os resíduos.

H1: não existe normalidade entre os resíduos.

Com este p-valor não rejeitamos H0, ou seja, existe normalidade entre os resíduos considerando um nível de significância de 5%. Portanto, realiza-se o teste de Tukey para verificar quais tratamentos (tempos) diferem entre si.

Comparison	mean difference	q	p value
controle vs 1hora	-0.01533	0.5113	ns p>0.05
controle vs 4horas	-0.007000	0.2334	ns p>0.05
controle vs 12horas	-0.003000	0.09431	ns p>0.05
controle vs 24horas	0.03500	1.100	ns p>0.05
controle vs 48horas	0.1363	4.546 *	p<0.05
controle vs 72horas	0.05100	1.603	ns p>0.05
controle vs 96horas	-0.02867	0.9558	ns p>0.05
1hora vs 4horas	0.008333	0.2485	ns p>0.05
1hora vs 12horas	0.01233	0.3507	ns p>0.05
1hora vs 24horas	0.05033	1.431	ns p>0.05
1hora vs 48horas	0.1517	4.523 *	p<0.05
1hora vs 72horas	0.06633	1.886	ns p>0.05
1hora vs 96horas	-0.01333	0.3976	ns p>0.05
4horas vs 12horas	0.004000	0.1137	ns p>0.05
4horas vs 24horas	0.04200	1.194	ns p>0.05

4horas vs 48horas	0.1433	4.275 ns	p>0.05
4horas vs 72horas	0.05800	1.649 ns	p>0.05
4horas vs 96horas	-0.02167	0.6462 ns	p>0.05
12horas vs 24horas	0.03800	1.035 ns	p>0.05
12horas vs 48horas	0.1393	3.962 ns	p>0.05
12horas vs 72horas	0.05400	1.470 ns	p>0.05
12horas vs 96horas	-0.02567	0.7298 ns	p>0.05
24horas vs 48horas	0.1013	2.881 ns	p>0.05
24horas vs 72horas	0.01600	0.4356 ns	p>0.05
24horas vs 96horas	-0.06367	1.810 ns	p>0.05
48horas vs 72horas	-0.08533	2.426 ns	p>0.05
48horas vs 96horas	-0.1650	4.921 *	p<0.05
72horas vs 96horas	-0.07967	2.265 ns	p>0.05

Variável: número de lamelas secundárias (LS) com descolamento brando

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Fonte De Variação	G.L.	Soma Quadrados	De Quadrado Médio	F	P-Valor
Tratamentos	7	0.08386	0.01198	4.460	0,0009
Resíduo	41	0.1101	0.002686		
Total	48	0.1940			

Por esta análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H0, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento e no controle diferem entre si.

Verificando os pressupostos da Anova:

A) Homocedasticidade:

A homocedasticidade é avaliada pelo teste de Bartlett onde tem-se a estatística do teste = 14,535 com p-valor de 0,0143

Hipóteses testadas:

H0: existe homocedasticidade entre os tratamentos.

H1: não existe homocedasticidade entre os tratamentos.

Com este p-valor rejeitamos H0, ou seja, não existe homocedasticidade entre os tratamentos considerando um nível de significância de 5%. Como este pré-requisito da Anova não foi atendido usaremos método não paramétrico para avaliar os dados.

Hipóteses testadas:

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Através do teste de Kruska-Wallis, obtivemos a estatística do teste = 25,322 com p-valor de 0,0007. Considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H0, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento diferem entre si. Como no teste de Kruska-Wallis constatamos que existe diferença entre as proporções realiza-se o teste de Dunnet para verificar quais tratamentos (tempos) diferem entre si.

Comparison	Mean Rank	Difference	P value
CONTROLE vs. 1HORA	16.333	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 4HORAS	10.833	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 12HORAS	21.250	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 24HORAS	7.050	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 48HORAS	-7.083	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 72HORAS	-11.150	ns	P>0.05

CONTROLE vs. 96HORAS	-3.750 ns P>0.05
1HORA vs. 4HORAS	-5.500 ns P>0.05
1HORA vs. 12HORAS	4.917 ns P>0.05
1HORA vs. 24HORAS	-9.283 ns P>0.05
1HORA vs. 48HORAS	-23.417 ns P>0.05
1HORA vs. 72HORAS	-27.483 * P<0.05
1HORA vs. 96HORAS	-20.083 ns P>0.05
4HORAS vs. 12HORAS	10.417 ns P>0.05
4HORAS vs. 24HORAS	-3.783 ns P>0.05
4HORAS vs. 48HORAS	-17.917 ns P>0.05
4HORAS vs. 72HORAS	-21.983 ns P>0.05
4HORAS vs. 96HORAS	-14.583 ns P>0.05
12HORAS vs. 24HORAS	-14.200 ns P>0.05
12HORAS vs. 48HORAS	-28.333 * P<0.05
12HORAS vs. 72HORAS	-32.400 ** P<0.01
12HORAS vs. 96HORAS	-25.000 ns P>0.05
24HORAS vs. 48HORAS	-14.133 ns P>0.05
24HORAS vs. 72HORAS	-18.200 ns P>0.05
24HORAS vs. 96HORAS	-10.800 ns P>0.05
48HORAS vs. 72HORAS	-4.067 ns P>0.05
48HORAS vs. 96HORAS	3.333 ns P>0.05
72HORAS vs. 96HORAS	7.400 ns P>0.05

Variável: número de LS com descolamento moderado

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Fonte De Variação	G.L.	Soma De Quadrados	Quadrado Médio	F	P-Valor
Tratamentos	7	0.05788	0.008269	3.188	0,0087
Resíduo	41	0.1063	0.002593		
Total	48	0.1642			

Por esta análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H0, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento e no controle diferem entre si.

Verificando os pressupostos da Anova:

- A) Homocedasticidade: a homocedasticidade é avaliada pelo teste de Bartlett onde tem-se a estatística do teste = 9,447 com p-valor de 0,2221

Hipóteses testadas:

H0: existe homocedasticidade entre os tratamentos.

H1: não existe homocedasticidade entre os tratamentos.

Com este p-valor não rejeitamos H0, ou seja, existe homocedasticidade entre os tratamentos considerando um nível de significância de 5%.

- B) Normalidade dos resíduos: a normalidade dos resíduos é avaliada através do teste de Shapiro-Wilks onde obtém-se a estatística do teste = 0.8911 com p-valor de 0,00015

Hipóteses testadas:

H0: existe normalidade entre os resíduos.

H1: não existe normalidade entre os resíduos.

Com este p-valor rejeitamos H0 ou seja não existe normalidade entre os resíduos considerando um nível de significância de 5%. Como este pré-requisito da Anova não foi atendido usaremos método não paramétrico para avaliar os dados.

Hipóteses testadas:

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Através do teste de Kruska-Wallis, obtivemos a estatística do teste = 17,502 com p-valor de 0,0144. Considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H₀, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento diferem entre si. Portanto, realiza-se o teste de Dunnett para verificar quais tratamentos (tempos) diferem entre si.

Comparison	Mean Rank	Difference	P value
CONTROLE vs. 1HORA	5.567	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 4HORAS	-4.850	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 12HORAS	-1.550	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 24HORAS	-22.650	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 48HORAS	-12.767	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 72HORAS	-9.250	ns	P>0.05
CONTROLE vs. 96HORAS	-16.017	ns	P>0.05
1HORA vs. 4HORAS	-10.417	ns	P>0.05
1HORA vs. 12HORAS	-7.117	ns	P>0.05
1HORA vs. 24HORAS	-28.217	*	P<0.05
1HORA vs. 48HORAS	-18.333	ns	P>0.05
1HORA vs. 72HORAS	-14.817	ns	P>0.05
1HORA vs. 96HORAS	-21.583	ns	P>0.05
4HORAS vs. 12HORAS	3.300	ns	P>0.05
4HORAS vs. 24HORAS	-17.800	ns	P>0.05
4HORAS vs. 48HORAS	-7.917	ns	P>0.05
4HORAS vs. 72HORAS	-4.400	ns	P>0.05
4HORAS vs. 96HORAS	-11.167	ns	P>0.05
12HORAS vs. 24HORAS	-21.100	ns	P>0.05
12HORAS vs. 48HORAS	-11.217	ns	P>0.05
12HORAS vs. 72HORAS	-7.700	ns	P>0.05
12HORAS vs. 96HORAS	-14.467	ns	P>0.05
24HORAS vs. 48HORAS	9.883	ns	P>0.05
24HORAS vs. 72HORAS	13.400	ns	P>0.05
24HORAS vs. 96HORAS	6.633	ns	P>0.05
48HORAS vs. 72HORAS	3.517	ns	P>0.05
48HORAS vs. 96HORAS	-3.250	ns	P>0.05
72HORAS vs. 96HORAS	-6.767	ns	P>0.05

Variável: número de LS com desolamento severo

H₀: as proporções amostrais não diferem entre si.

H₁: as proporções diferem entre si.

Fonte De Variação	G.L.	Soma Quadrados	De Quadrado Médio	F	P-Valor
Tratamentos	7	0.3080	0.04399	5.204	0,0003
Resíduo	41	0.3466	0.008454		
Total	48	0.6546			

Por esta análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H₀, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento e no controle diferem entre si.

Verificando os pressupostos da Anova:

A) Homocedasticidade:

A homocedasticidade é avaliada pelo teste de Bartlett onde tem-se a estatística do teste = 19,003 com p-valor < 0,0079.

Hipóteses testadas:

H₀: existe homocedasticidade entre os tratamentos.

H₁: não existe homocedasticidade entre os tratamentos.

Com este p-valor rejeitamos H0, ou seja, não existe homocedasticidade entre os tratamentos considerando um nível de significância de 5%. Como este pré-requisito da anova não foi atendido usaremos método não paramétrico para avaliar os dados.

Hipóteses testadas:

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Através do teste de Kruska-Wallis, obtivemos a estatística do teste = 25,449 com p-valor de 0,0006. Considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H0, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento diferem entre si. Portanto, realiza-se o teste de Dunnet para verificar quais tratamentos (tempos) diferem entre si.

comparison	mean rank difference	p value
controle vs. 1hora	12.367 ns	p>0.05
controle vs. 4horas	5.033 ns	p>0.05
controle vs. 12horas	7.500 ns	p>0.05
controle vs. 24horas	-8.700 ns	p>0.05
controle vs. 48horas	-21.133 ns	p>0.05
controle vs. 72horas	-12.700 ns	p>0.05
controle vs. 96horas	-7.550 ns	p>0.05
1hora vs. 4horas	-7.333 ns	p>0.05
1hora vs. 12horas	-4.867 ns	p>0.05
1hora vs. 24horas	-21.067 ns	p>0.05
1hora vs. 48horas	-33.500 **	p<0.01
1hora vs. 72horas	-25.067 ns	p>0.05
1hora vs. 96horas	-19.917 ns	p>0.05
4horas vs. 12horas	2.467 ns	p>0.05
4horas vs. 24horas	-13.733 ns	p>0.05
4horas vs. 48horas	-26.167 *	p<0.05
4horas vs. 72horas	-17.733 ns	p>0.05
4horas vs. 96horas	-12.583 ns	p>0.05
12horas vs. 24horas	-16.200 ns	p>0.05
12horas vs. 48horas	-28.633 *	p<0.05
12horas vs. 72horas	-20.200 ns	p>0.05
12horas vs. 96horas	-15.050 ns	p>0.05
24horas vs. 48horas	-12.433 ns	p>0.05
24horas vs. 72horas	-4.000 ns	p>0.05
24horas vs. 96horas	1.150 ns	p>0.05
48horas vs. 72horas	8.433 ns	p>0.05
48horas vs. 96horas	13.583 ns	p>0.05
72horas vs. 96horas	5.150 ns	p>0.05

Variável: número de LS com descolamento intenso

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Fonte De Variação	G.L.	Soma De Quadrados	Quadrado Médio	F	P-Valor
Tratamentos	7	0.5908	0.0844	9.59	< 0,0001
Resíduo	41	0.3608	0.0088		
Total	48	0.9516			

Por esta análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H0, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento e no controle diferem entre si.

Verificando os pressupostos da Anova:

- A) Homocedasticidade: a homocedasticidade é avaliada pelo teste de Bartlett onde tem-se a Estatística do teste = 54,46 com p-valor < 0,0001.

Hipóteses testadas:

H0: existe homocedasticidade entre os tratamentos.

H1: não existe homocedasticidade entre os tratamentos.

Com este p-valor rejeitamos H0, ou seja, não existe homocedasticidade entre os tratamentos considerando um nível de significância de 5%. Como este pré-requisito da Anova não foi atendido usaremos método não paramétrico para avaliar os dados.

Hipóteses testadas:

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Através do teste de Kruska-Wallis, obtivemos a estatística do teste = 26,594 com p-valor de 0,0004. Considerando um nível de significância de 5%, rejeitamos H0, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento diferem entre si. Como no teste de Kruska-Wallis constatamos que existe diferença entre as proporções realiza-se o teste de Dunnet para verificar quais tratamentos (tempos) diferem entre si.

comparison	mean rank difference	p value
controle vs. 1hora	5.983	ns p>0.05
controle vs. 4horas	2.733	ns p>0.05
controle vs. 12horas	-1.500	ns p>0.05
controle vs. 24horas	-10.800	ns p>0.05
controle vs. 48horas	-26.767	** p<0.01
controle vs. 72horas	-16.500	ns p>0.05
controle vs. 96horas	-11.850	ns p>0.05
1hora vs. 4horas	-3.250	ns p>0.05
1hora vs. 12horas	-7.483	ns p>0.05
1hora vs. 24horas	-16.783	ns p>0.05
1hora vs. 48horas	-32.750	** p<0.01
1hora vs. 72horas	-22.483	ns p>0.05
1hora vs. 96horas	-17.833	ns p>0.05
4horas vs. 12horas	-4.233	ns p>0.05
4horas vs. 24horas	-13.533	ns p>0.05
4horas vs. 48horas	-29.500	** p<0.01
4horas vs. 72horas	-19.233	ns p>0.05
4horas vs. 96horas	-14.583	ns p>0.05
12horas vs. 24horas	-9.300	ns p>0.05
12horas vs. 48horas	-25.267	ns p>0.05
12horas vs. 72horas	-15.000	ns p>0.05
12horas vs. 96horas	-10.350	ns p>0.05
24horas vs. 48horas	-15.967	ns p>0.05
24horas vs. 72horas	-5.700	ns p>0.05
24horas vs. 96horas	-1.050	ns p>0.05
48horas vs. 72horas	10.267	ns p>0.05
48horas vs. 96horas	14.917	ns p>0.05
72horas vs. 96horas	4.650	ns p>0.05

Variável: Hiperplasia

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Fonte De Variação	G.L.	Soma Quadrados	De Quadrado Médio	F	P-Valor
Tratamentos	7	25.713	3.673	0.8308	0,5679

Resíduo	41	181.27	4.421
Total	48	206,98	

Por esta análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, não rejeitamos H₀, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento e no controle não diferem entre si.

Verificando os pressupostos da anova:

A) Homocedasticidade:

a homocedasticidade é avaliada pelo teste de Bartlett onde tem-se a estatística do teste = 27,139 com p-valor 0,0003.

Hipóteses testadas:

H₀: existe homocedasticidade entre os tratamentos.

H₁: não existe homocedasticidade entre os tratamentos.

Com este p-valor rejeitamos H₀, ou seja, não existe homocedasticidade entre os tratamentos considerando um nível de significância de 5%. Como este pré-requisito da Anova não foi atendido usaremos método não paramétrico para avaliar os dados.

Hipóteses testadas:

H₀: as proporções amostrais não diferem entre si.

H₁: as proporções diferem entre si.

Através do teste de Kruska-Wallis, obtivemos a estatística do teste = 3,587 com p-valor de 0,8259. Considerando um nível de significância de 5%, não rejeitamos H₀, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento não diferem entre si.

Variável: Fusão

Como apenas quatro variáveis foram constatadas com normalmente distribuídas pelo teste Kolmogorov-Smirnof usaremos método não paramétrico para avaliar os dados.

Hipóteses testadas:

H₀: as proporções amostrais não diferem entre si.

H₁: as proporções diferem entre si.

Através do teste de Kruska-Wallis, obtivemos a estatística do teste = 5,284 com p-valor de 0,6253.

Considerando um nível de significância de 5%, não rejeitamos H₀, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento não diferem entre si.

Variável: Aneurisma

H₀: as proporções amostrais não diferem entre si.

H₁: as proporções diferem entre si.

Fonte De Variação	G.L.	Soma Quadrados	De Quadrado Médio	F	P-Valor
Tratamentos	7	5.909	0.8441	1.514	0,1899
Resíduo	41	22.867	0.5577		
Total	48	28.776			

Por esta análise de variância, considerando um nível de significância de 5%, não rejeitamos H₀, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento e no controle não diferem entre si.

Verificando os pressupostos da Anova:

a) Homocedasticidade:

a homocedasticidade é avaliada pelo teste de Bartlett onde tem-se a estatística do teste = 2,21379 com p-valor 0,0002.

hipóteses testadas:

H₀: existe homocedasticidade entre os tratamentos.

H1: não existe homocedasticidade entre os tratamentos.

Com este p-valor rejeitamos H0, ou seja, não existe homocedasticidade entre os tratamentos considerando um nível de significância de 5%. Como este pré-requisito da Anova não foi atendido usaremos método não paramétrico para avaliar os dados.

Hipóteses testadas:

H0: as proporções amostrais não diferem entre si.

H1: as proporções diferem entre si.

Através do teste de Kruska-Wallis, obtivemos a estatística do teste = 10,357 com p-valor de 0,1692. Considerando um nível de significância de 5%, não rejeitamos H0, ou seja, constata-se que as proporções nas diferentes doses (horas) do tratamento não diferem entre si.

