

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**



**ECOTOXICIDADE, SEGURANÇA CLÍNICA E  
EFICÁCIA DE FÁRMACOS EM JOVENS DE  
PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

**Silvia Patrícia Carraschi-Oliveira**

Jaboticabal, São Paulo  
**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**ECOTOXICIDADE, SEGURANÇA CLÍNICA E  
EFICÁCIA DE FÁRMACOS EM JOVENS DE  
PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

**Silvia Patrícia Carraschi-Oliveira**

**Orientadora: Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva**

**Co orientador: Dr. Claudinei da Cruz**

Tese apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Aquicultura do Centro de Aquicultura  
da UNESP – CAUNESP, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor.

**Jaboticabal – São Paulo**

**2014**

Carraschi-Oliveira, Silvia Patrícia  
C313e Ecotoxicidade, segurança clínica e eficácia de fármacos  
em jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Silvia  
Patrícia Carraschi de Oliveira – Jaboticabal, 2014

xiii, 101 f.; il.; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista,  
Centro de Aquicultura da Unesp, 2014

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani Paiva

Co-orientador: Claudinei da Cruz

Banca examinadora: Márcia Rita Fernandes Machado,  
Marco Antonio de Andrade Belo, Eduardo Makoto Onaka,  
Gilson Pereira

Bibliografia

1. Doenças. 2. Quimioterápicos. 3. Bioindicador. 4.  
Hematologia. 5. Toxicologia I. Título. II. Jaboticabal-  
Centro de Aquicultura da Unesp.

CDU 639.3.09

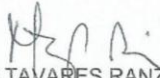
Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da  
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de  
Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


**TÍTULO:** ECOTOXICIDADE, SEGURANÇA CLÍNICA E EFICÁCIA DE FÁRMACOS EM JOVENS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

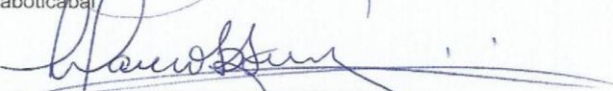
**AUTORA:** SILVIA PATRÍCIA CARRASCHI DE OLIVEIRA  
**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA  
**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA  
/ Instituto de Pesca de São Paulo

  
Prof. Dr. EDUARDO MAKOTO ONAKA  
Departamento de Descentralização do Desenvolvimento / Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

  
Profa. Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO  
/ Universidade Camilo Castelo Branco

  
Prof. Dr. GILSON PÉREIRA DE OLIVEIRA  
CPPAR, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP

Data da realização: 28 de janeiro de 2014.

***“Educação não transforma o mundo.***

***Educação muda pessoas.***

***Pessoas transformam o mundo”***

***Paulo Freire***

***Dedico***

***Aos meus pais, Angela Ap. Travensolo Carraschi e Clóvis Ap. Carraschi e ao meu marido Cleber H. Oliveira que sempre me apoiaram para que a realização deste sonho pudesse se tornar realidade. A eles minha eterna gratidão...***

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela saúde e por me guiar em cada decisão da minha vida, as quais fizeram com que eu pudesse chegar até este momento.

Ao meu querido coorientador Prof. Dr. Claudinei da Cruz que acompanha meus passos científicos desde 2005, sendo meu pai científico, amigo e/ou professor, sempre me incentivando em cada etapa, em cada obstáculo. Obrigada Querido Chefe, agora meu compadre, por todo apoio, dedicação e atenção, as quais foram indispensáveis em todo meu período de doutorado.

À minha orientadora Profa Dra Maria José Tavares Ranzani de Paiva por abrir a porta para o doutorado, me aceitando mesmo sem me conhecer e me apoiando durante todo o período. Obrigada Querida Masé, ou Mãesé como carinhosamente é citada por muitos alunos, por toda paciência e confiança em mim.

Aos professores da minha banca de qualificação e defesa: Dra Maria Isabel Mataqueiro, Dr. Eduardo Makoto Onaka, Dr. Gilson Pereira, Dra Márcia Rita Fernandes Machado e Dr. Marco Antonio de Andrade Belo, sempre com sugestões enriquecedoras.

Ao Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli, que me concedeu toda a estrutura do seu laboratório NEPEAM para que eu pudesse desenvolver os experimentos de doutorado. Obrigada pela confiança e companheirismo.

Ao meu marido Cleber Henrique de Oliveira que por muitas vezes sentiu minha ausência por necessitar passar horas no computador escrevendo resumos de congressos, relatórios, artigos e a tese, e por muitas vezes me ajudar na prática dos experimentos, na digitação dos dados e até mesmo na discussão dos resultados. Obrigada pelo companheirismo, paciência e por entender o quanto a pós graduação é importante para minha formação acadêmica.

À minha família, especialmente meus pais Angela e Clóvis e meu irmão Maicon, que convivem com minha ausência por conta da distância e mesmo longe, nunca deixaram de me conceder uma palavra de aconchego, de carinho, de apoio e de atenção. Obrigada, família que ganhei de Deus, pela força e confiança e por nunca deixarem de acreditar em mim que um dia este sonho pudesse ser realidade.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, que compõe a equipe NEPEAM que fazem qualquer pós graduação se tornar possível, por meio da amizade e companheirismo auxiliando sempre nos projetos: Cynthia, Roberto, Taise, Adilson, Alfredo, Igor, Joani, Naiara, Nathália, Ana Cristina, Jéssica e Aline. Obrigada por toda a ajuda nos mais de mil experimentos realizados, sem vocês nada disso seria possível.

À Daniele Dias que me auxiliou nas análises de sangue e na discussão dos resultados e a equipe da Apta de Pirassununga: Guilherme, Tashibana e Fabinho que me acolheram e me ajudaram durante as análises.

Ao Prof. Dr. Joaquim G. Machado Neto por me conceder seu laboratório para realizar os ensaios de toxicidade com *Daphnia magna*, obrigada pela confiança e disponibilidade e a suas alunas Ana Carla e Angela que me auxiliaram nos experimentos.

À Profa Dra Márcia Machado que me concedeu seu laboratório para realizarmos as rotinas histológicas, meu eterno obrigada.

Às minhas eternas amigas e companheiras Ana Carla, Camila, Carolina, Livia e Marita, amizade que conquistei ao entrar na faculdade em 2004 e que mantemos mesmo com a distância. Obrigada por toda amizade, por todas as nossas conversas, risadas, choros, refeições, grupos de estudo, etc., enfim foram muitos momentos vividos, momentos estes que foram indispensáveis para superar cada obstáculo durante esta fase.

Ao meu amigo de pós graduação Santiago Benides de Pádua que me auxiliou nas análises hematológicas, a Thaís Farias auxiliou nas coletas de sangue e ao Alfredo Yamauchi que analisou as estatísticas dos meus ensaios.

Aos funcionários do Caunesp: Waldecir, Márcio, Donizete, David e Vera que sempre se dispuseram a me ajudar no que fosse preciso.

Agradeço a FAPESP pelo financiamento da pesquisa e pela Bolsa concedida proc. nº 2010/09888-6 e 2011/08453-9.



## ÍNDICE DE TABELA

	Pág
<b>MANUSCRITO 1. ECOTOXICIDADE DE FÁRMACOS E SUAS ASSOCIAÇÕES PARA ORGANISMO ALVO E NÃO ALVOS</b>	
<b>Tabela 1.</b> Concentrações (mg.L <sup>-1</sup> ) dos fármacos utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para os peixes.....	13
<b>Tabela 2.</b> Concentrações dos fármacos utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para <i>Pomacea canaliculata</i> .....	14
<b>Tabela 3.</b> Concentrações dos fármacos utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para <i>Lemna minor</i> .....	15
<b>Tabela 4.</b> Concentrações dos fármacos utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para o microcrustáceo, <i>Daphnia magna</i> .....	16
<b>Tabela 5.</b> Concentração letal (CL50;48h) dos fármacos e suas associações para <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	20
<b>Tabela 6.</b> Concentração letal (CL50;48h) dos fármacos e suas associações para o <i>Hyphessobrycon eques</i> .....	22
<b>Tabela 7.</b> Concentração efetiva (CE50;48h) dos fármacos e suas associações para <i>Pomacea canaliculata</i> .....	24
<b>Tabela 8.</b> Concentração letal (CL50;48h) dos fármacos e suas associações para a macrófita aquática <i>Lemna. minor</i> .....	26
<b>Tabela 9.</b> Concentração efetiva (CE50;48h) dos fármacos e suas associações para o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> .....	27
<b>Tabela 10.</b> Avaliação da Soma (S) e do Índice de Aditividade (IA) das associações utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda para os organismos teste.....	28
<b>Tabela 11.</b> Risco de intoxicação ambiental dos fármacos para os organismos teste.....	29
<b>ARTICLE 2 – EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC AGENTS IN DISEASE TREATMENT IN <i>Piaractus mesopotamicus</i></b>	
<b>Table 1.</b> Range of bacterial count estimates in scraped epithelial samples from pacu.....	42
<b>Table 2.</b> Effectiveness of toltrazuril and enrofloxacin in control of parasites	46

and bacteria in pacu, *P. Mesopotamicus*, in microcosm conditions.....

**Table 3.** Effectiveness of thiamethoxan in control of *A penilabiatu*s in pacu, *P. mesopotamicus*, in laboratory conditions..... 48

**Table 4.** Effectiveness of thiamethoxan in control of *A penilabiatu*s in pacu, *P. mesopotamicus*, in microcosm conditions..... 49

**MANUSTRITO 3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E HEMATOLÓGICA DE PACU *PIARACTUS MESOPOTAMICUS*) APÓS TRATAMENTO COM FÁRMACOS**

**Tabela 1.** Valores médios ± erro padrão das variáveis hematológicas de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, após tratamento com Toltrazuril e Enrofloxacina..... 61

**Tabela 2.** Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Toltrazuril e Enrofloxacina..... 61

**Tabela 3.** Valores médios e erro padrão das variáveis bioquímicas de pacus, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Toltrazuril e Enrofloxacina..... 62

**Tabela 4.** Valores médios e erro padrão de leucócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Thiamethoxan e Florfenicol..... 63

**Tabela 5.** Valores médios e erro padrão das variáveis hematológicas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Thiamethoxan e Florfenicol..... 65

**Tabela 6.** Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Thiamethoxan e Florfenicol. 65

**Tabela 7.** Valores médios e erro padrão de leucócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Thiamethoxan e Florfenicol..... 66

**Tabela 8.** Valores médios e erro padrão das variáveis bioquímicas de pacus, *P. mesopotamicus* tratados com Thiamethoxan e Florfenicol..... 67

**Tabela 9.** Alterações em brânquias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* em ensaio com Toltrazuril e Enrofloxacina no controle de ectoparasitos e bactérias..... 69

<b>Tabela 10.</b> Alterações em brânquias de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> em ensaio com Thiamthoxan e Florfenicol no controle de monogénéticos e bactérias.....	74
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
<b>MANUSCRITO 1. ECOTOXICIDADE DE FÁRMACOS E SUAS ASSOCIAÇÕES PARA ORGANISMO ALVO E NÃO ALVOS</b>	
<b>Figura 1.</b> Organismos teste utilizados nos ensaios de toxicidade aguda. A. Caixa de aclimação dos peixes. B. Exemplar de <i>Piaractus mesopotamicus</i> . C. Seleção de <i>Hyphessobrycon eques</i> . D. Exemplar de <i>Pomacea canaliculata</i> . E. Caixa de aclimação de <i>Pomacea canaliculata</i> . F. Caixas de cultura de <i>Lemna minor</i> . G. Aclimação de <i>Lemna minor</i> em sala de bioensaio. H. Cristalizadores em que são cultivados os microcrustáceos <i>Daphnia magna</i> . I. Tubo de 15 mL que compõe cada réplica utilizada no ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> .....	18
<b>Figura 2.</b> Oxigênio dissolvido durante ensaio de toxicidade aguda do Thiamethoxan para o pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	20
<b>Figura 3.</b> Oxigênio dissolvido durante ensaio de toxicidade aguda do Thiamethoxan para o mato grosso, <i>Hyphessobrycon eques</i> .....	23
<b>Figura 4.</b> Oxigênio dissolvido durante ensaio de toxicidade aguda do Thiamethoxan para o caramujo, <i>P. canaliculata</i> .....	24
<b>ARTICLE 2 – EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC AGENTS IN DISEASE TREATMENT IN <i>Piaractus mesopotamicus</i></b>	
<b>MANUSCRITO 3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E HEMATOLÓGICA DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) APÓS TRATAMENTO COM FÁRMACOS</b>	
<b>Figura 1.</b> Fotomicrografias de brânquias de <i>Piaractus mesopotamicus</i> . Em A, peixe que foi Tratado com os fármacos. B, o Controle Sadio. C, antes de iniciar o tratamento. D, o Controle infestado e em E, Controle exposto. Linha: aumento do eitélio interlamelar. SVC: seio venoso central. LP: lamela primária. LS: lamela secundária, Ictio: <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> , Monog.: monogenético <i>Anacanthorus penilabiatus</i> . Setas: Desestruturação das lamelas secundárias. Coloração HE.....	69
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografias de fígado e rins de <i>Piaractus mesopotamicus</i> . Em A peixe com patógenos antes de iniciar o tratamento. B, o Controle Infestado. C, peixe Tratado. e D, Rim de peixe tratado. Seta: aumento do dimâmetro dos capilares. Glicogênio nos hepatócitos. Asterisco: hipertrofia dos hepatócitos. TP: túbulos proximais, TD: túbulos distais. TH: tecido hematopoiético. Cabeça de	72

- seta: centro melanomacrófagos. Coloração PAS em B, as demais, HE.....
- Figura 3.** Fotomicrografias de pele de *Piaractus mesopotamicus*. Em A, peixe do Controle Sadio, B e C, Controle infestado. D: Tratado. Setas: células mucosas, Cabeça de seta: muco substâncias. Reta: espessamento da epiderme. A. Coloração HE, as demais, PAS..... 73
- Figura 4.** Fotomicrografias de brânquias de *Piaractus mesopotamicus*. Em A. Brânquias de pacu do CS. B. CEX. C e D. CIn. E. Tratados com TH+FFC. LP: lamela primária. LS: lamela secundária. SVC: seio venoso central. Seta: células pilares. An: aneurisma. DLS: desestruturação da lamela secundária. Mono: monogenético *Anacanthorus penilabiatus*. Hip: hiperplasia interlamelar. A, B, D, E: coloração PAS. C: coloração HE..... 75
- Figura 5.** Fotomicrografias de fígado e rins de *Piaractus mesopotamicus*. Em A, controle sadio. B, Controle Infestado. C, Tratados e em D, Rins de pacu tratados. Linha: Arranjo cordonal dos hepatócitos. Seta: capilares sinusóides. TP: túbulo proximal. TD: túbulo distal. TH: tecido hematopoiético. CM: centro melanomacrófagos. G: glomérulo dentro da capsula glomerular. Note em B: pouco glicogênio nos hepatócitos e em C: glicogênio polarizado dentro do hepatócitos. D: coloração HE, as demais, PAS..... 77

## QUADRO DE ABREVIATURAS

**FFC:** florfenicol

**ENRO:** enrofloxacin

**TOL:** toltrazuril

**TH:** thiamethoxan

**TOL+ENRO:** toltrazuril + enrofloxacin

**FFC+TH:** florfenicol + thiamethoxan

**IA:** índice de aditividade

**S:** soma para efeito da interatividade das substâncias

**RQ:** Risco ambiental

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELA</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>QUADRO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>3</b>
<b>2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>5</b>
<b>MANUSCRITO 1 - ECOTOXICIDADE DE FÁRMACOS E SUAS ASSOCIAÇÕES PARA ORGANISMO ALVO E NÃO ALVO</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 Ensaio de toxicidade aguda para peixes .....	12
2.2 Ensaio de toxicidade aguda para o caramujo <i>Pomacea canaliculata</i> .....	13
2.3. Toxicidade aguda para a macrófita aquática <i>Lemna minor</i> .....	14
2.4 Toxicidade aguda para o microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> .....	15
2.5 Interatividade das substâncias nas associações .....	16
2.6 Risco de intoxicação ambiental dos fármacos para os organismos teste.....	17
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>18</b>
3.1. Toxicidade aguda para o organismo alvo <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	18
3.2 Toxicidade aguda para os organismos bioindicadores .....	21
3.2.1 <i>Hyphessobrycon eques</i> .....	21
3.2.2 <i>Pomacea canaliculata</i> .....	23
3.2.3 <i>Lemna minor</i> .....	25
3.2.4. <i>Daphnia magna</i> .....	26
3.3. Interatividade das associações.....	27
3.4 Risco de intoxicação ambiental dos fármacos.....	28
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>32</b>
<b>ARTICLE 2 – EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC AGENTS IN DISEASE TREATMENT IN <i>Piaractus mesopotamicus</i></b> .....	<b>38</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>40</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>41</b>
2.1 EVALUATING THE EFFICACY OF TOLTRAZURIL AND ENROFLOXACIN .....	41
2.2 EVALUATING THE EFFICACY OF THIAMETHOXAN AND FLORFENICOL .....	43
2.3 MICROBIOLOGICAL ANALYSIS .....	44
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	<b>45</b>

3.1 TOLTRAZURIL AND ENROFLOXACIN EFFICACY .....	45
3.2. THIAMETHOXAN AND FLORFENICOL EFFICACY .....	48
<b>4. REFERENCES .....</b>	<b>50</b>
<b>MANUSCRITO 3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E HEMATOLÓGICA DE PACU APÓS TRATAMENTO COM FÁRMACOS .....</b>	<b>55</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
2.1 Análises hematológicas e bioquímicas .....	59
2.2 Análises histopatológicas .....	60
2.3 Análise dos dados .....	60
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
3.1 Análises hematológicas e bioquímicas do sangue de pacu após tratamento com Toltrazuril e Enrofloxacin .....	60
3.2 Análises hematológicas e bioquímicas do sangue de pacu após tratamento com Thiamethoxan e Florfenicol .....	64
3.3 Análises histopatológicas de pacu após tratamento com Toltrazuril e Enrofloxacin .....	68
3.3.1 Brânquias .....	68
3.3.2 Fígado e Rim .....	71
3.3.3 Pele .....	73
3.4 Histopatologia de <i>Piaractus mesopotamicus</i> após tratamento com Florfenicol e Thiamethoxan .....	74
3.4.1 Brânquia .....	74
3.4.2 Fígado e Rim .....	76
<b>4. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>78</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>



## ECOTOXICIDADE, SEGURANÇA CLÍNICA E EFICÁCIA DE FÁRMACOS EM JOVENS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

### RESUMO

O uso de fármacos no tratamento de doenças dos animais de criação na aquicultura é uma prática comum, devido ao manejo intensivo e a ocorrência de patógenos que podem causar perdas na produtividade. Objetivou-se avaliar quatro fármacos, a enrofloxacin (ENRO), o toltrazuril (TOL); o florfenicol (FFC) e o thiamethoxan (TH) no controle de parasitos e bactérias em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), avaliar as variáveis histológicas e hematológicas após o tratamento e avaliar a toxicidade destes fármacos para o organismo alvo *Piaractus mesopotamicus* e para os bioindicadores: mato grosso (*Hyphessobrycon eques*); *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata* e *Daphnia magna*. Nos ensaios de toxicidade os organismos foram aclimatados em salas de bioensaio de acordo com as normas vigentes para cada organismo e foram expostos às concentrações nominais em sistema estático. A eficácia do TOL no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina heterodontata* e *Anacanthorus penilabiatus* e da ENRO, de *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp foi avaliada em micro e mesocosmo. A eficácia do TH no controle de *A. penilabiatus* foi prospectada em laboratório e microcosmo e associado ao FFC, no controle de *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp, em mesocosmo. Após a eficácia em mesocosmo foi coletado sangue, para a análise hematológica e tecidos, para análise histopatológica. O FFC, a ENRO e o TH são pouco tóxicos e o TOL, moderadamente tóxico, pois o bioindicador *L. minor* foi o *end point* para o FFC; o caramujo, para a ENRO e o mato grosso, para o TOL e TH. O TOL é eficaz no controle de *I. multifiliis* e *T. heterodontata*, o TH, contra *A. penilabiatus* e a ENRO e o FFC, *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp. Os fármacos não causam alterações hematológicas e histopatológicas que comprometam o desempenho zootécnico dos animais, sendo moléculas potenciais para obter registro brasileiro no tratamento de *P. mesopotamicus*.

**Palavras chave:** doenças, quimioterápicos, bioindicador, hematologia, toxicologia

## ABSTRACT

The therapeutics use in the fish disease treatment is a common practice, due at intensive management and pathogens appearance that can cause high mortality rate. The objectives were to evaluate four drugs: enrofloxacin (ENRO), toltrazuril (TOL); florfenicol (FFC) and thiamethoxan (TH) in the pathogens control in pacu (*Piaractus mesopotamicus*), to evaluate the hemathological and histopathological variables after treatment and to evaluate the toxicity these drugs for target organism *Piaractus mesopotamicus* and for bioindicators: mato grosso (*Hyphessobrycon eques*); *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata* and *Daphnia magna*. The organisms were acclimated in room bioassay with controlled temperature according to standard to each one. They were exposed at nominal concentrations in static system. The efficacy of TOL in the *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina heterodontata* and *Anacanthorus penilabiatus* control and ENRO, of *Aeromonas* sp and *Streptococcus* sp was evaluated in micro and mesocosm condition. The efficacy of TH in the *A. penilabiatus* control was prospected in laboratory and microcosmo and associated with FFC, in *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp control, in mesocosm. After the efficacy in mesocosm the blood was collected for hematology analysis and tissues for histopathology. FFC, ENRO and TH are few toxics and TOL, moderately toxic, because the bioindicator *L. minor* was the *end point* for FFC; the snail, for ENRO and the mato grosso, for TOL and TH. TOL is effectiveness in *I. multifiliis* and *T. heterodontata* control, o TH in *A. penilabiatus* and ENRO and FFC, *Aeromonas* sp and *Streptococcus* sp. The drugs cause no hemathological and histopathological changes that compromises the development of fish, and they are potentials molecules to get the register in treatment of *P. mesopotamicus*.

**Key words:** disease, chemotherapeutical, bioindicator, hematology, toxicology

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de fármacos na aquicultura para o tratamento de doenças é inevitável durante o ciclo de criação. Os aspectos que envolvem a produção intensiva como a alta taxa de arraçoamento, manejo constante e elevada densidade de estocagem, proporcionam um ambiente favorável para o desenvolvimento e multiplicação de patógenos oportunistas que causam altas taxas de mortalidade.

Há poucos fármacos registrados para uso na aquicultura, o que proporciona o uso indiscriminado de várias substâncias químicas, que são administradas sem controle de dose/concentração, tempo de exposição, tempo de tratamento, e também período de carência para consumo. Os produtores precisam de compostos legalizados para conter as doenças (Jaafar e Buchmann, 2011). Dessa forma, o desenvolvimento de novas moléculas é fundamental para aumentar a possibilidade de sucesso no controle dos principais patógenos que ocorrem durante os ciclos de produção, diminuir as perdas causadas pela incidência de mortalidade, permitir a segurança do consumidor e do ambiente monitorando os efeitos nos organismos não alvos.

Dentre os patógenos, as bactérias dos gêneros *Aeromonas* e *Streptococcus* são as principais responsáveis pelas perdas econômicas durante o ciclo produtivo dos peixes de criação (Kunttu et al., 2009). O parasito *Ichthyophytherius multifiliis* é considerado o principal responsável por prejuízos, a nível mundial (Lima, 2004) e ocorre em interação com infecção por *Aeromonas hydrophila* (Liu e Lu, 2004), pois a infestação parasitária funciona como porta de entrada para a infecção bacteriana. Os monogenéticos são parasitos de brânquias e pele e causam grandes mortalidades no período de verão, geralmente associados à infestação com *Trichodina* sp. (Vargas et al., 1998); *Flavobacterium psychrophilum* e *Streptococcus iniae* (Xu et al., 2007). O gênero *Anacanthorus* envolve 63 espécies em que a *Anacanthorus penilabiatus* infesta brânquias de pacu e representa um risco em potencial na produtividade (Boeger et al., 1995).

O florfenicol (FFC) é um antibiótico fluorado derivado de tiamfenicol inibidor da síntese de proteína sobre a peptil transferase (Cannon et al., 1990), com registro brasileiro para o controle de *Aeromonas* sp e *Streptococcus agalactiae* em *Oreochromis niloticus* e *Yersinia ruckerii* em *Oncorhynchus mykiss* (Schering-Plough, 2009). Este apresenta 96,5% de biodisponibilidade em salmão utilizando 10 mg.kg<sup>-1</sup> e concentrações acima da mínima inibitória (MIC) mantidas no plasma até 40 horas após

a administração (Martinsen et al., 1993). O FFC é moderadamente tóxico para alga *Tetraselmis chuii* e praticamente não tóxico para o microcrustáceo *Artemia parthenogenetica* (Ferreira et al., 2007) e para *Piaractus mesopotamicus* (Carraschi et al., 2011).

Em virtude das poucas espécies registradas, são necessários estudos que possibilitem a expansão da sua utilização para outras espécies, como o pacu (*P. mesopotamicus*), peixe nativo muito cultivado e apreciado pelos consumidores.

A enrofloxacin (ENRO) é um antibiótico do grupo das fluoroquinolonas que inibe a atividade da DNA girase (Koc et al., 2009), com amplo espectro de ação e favoráveis propriedades farmacocinéticas, boa absorção via oral, alta biodisponibilidade com o metabólito ciprofloxacina apresentando atividade antimicrobiana (Brown, 1996). A ENRO é eficaz contra *Aeromonas salmonicida* (Hsu et al., 2007) e é altamente tóxica para algas e cianobactérias (*Selenastrum capricornutum* e *Microcystis aeruginosa*), porém não causa risco para microcrustáceo e peixes (EMEA, 1998).

O toltrazuril (TOL) é um parasiticida derivado de triazinetriona eficaz contra ciliados (Mehlhorn et al., 1988; Schmahl et al., 1989), monogenéticos (Schmahl e Mehlhorn, 1988), microsporídeos (Schmahl et al., 1990) e mixosporídeos (Bermúdez et al., 2006). O TOL causa redução das enzimas da cadeia respiratória dos parasitos e inibição da divisão nuclear (EMEA, 2008). Este é moderadamente tóxico para *Brachydanio rerio* (Carlsson et al., 2013) e *Daphnia magna* e altamente tóxico para *Oncorhynchus mykiss* (Bayer, 2006).

O thiamethoxan (TH) é um inseticida neonicotinóide, agonista dos receptores nicotínicos (Fernandes-Buzeiro et al., 2005), praticamente não tóxico (CL50 > 100 mg.L<sup>-1</sup>) para peixe, alga e microcrustáceo (Syngenta, 2006; Novartis, 2001). A atividade potencial dos neonicotinóides como fármaco é de grande interesse em diversas áreas (Tomizawa e Casida, 2003) e por isso, selecionado para ser prospectado para o tratamento de *A. penilabiatus* em *P. mesopotamicus*, neste trabalho.

O desenvolvimento da aquicultura depende da tomada de decisão sobre o tipo de fármaco a ser empregado e dos possíveis riscos para a saúde ambiental e do consumidor. Assim, faz-se necessários estudos que demonstrem a sua eficácia, a toxicidade e os possíveis efeitos sobre os organismos de criação a serem expostos aos quimioterápicos na forma de tratamento.

Para tanto, este estudo avaliou a toxicidade aguda dos fármacos TOL, TH, FFC, ENRO e das associações TOL+ENRO e TH+FFC para o organismo alvo pacu (*P. mesopotamicus*) e para os bioindicadores *Hyphessobrycon eques*, *Pomacea canaliculata*, *Lemna minor* e *Daphnia magna*; a eficácia do TOL no controle de monogenéticos (*A. penilabiatu*s), dos protozoários *T. heterodontata* e *I. multifiliis*; a eficácia do TH no controle de *A. penilabiatu*s; a eficácia do FFC e da ENRO no controle de bactérias *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp e as características hematológicas e histopatológicas do pacu após os tratamentos com os respectivos fármacos em condição de mesocosmo.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bayer. 2006. **Fispq Baycox®**. Toltrazuril. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico, 5 p.

Bermúdez, A.R.; Alemañ, B.N.; Vigliano, A.C.F.; Vásquez, A.S.; Quiroga, M.I.; Nieto, A.J.M. 2006. Effects of symmetric triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Enteromyxum scophthalmi* parasitizing turbot (*Scophthalmus maximus* L.): A light and electron microscopic study. **Aqu.**, 254, p. 65–71.

Boeger, W.A., Husak W.S., Martins M.L., 1995. Neotropical monogenoidea. 25. *Anacanthorus penilabiatu*s n. sp. (Dactylogiridae, Anacanthorinae) from *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Serrasalminidae), cultivated in the State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 90, p. 699-701.

Brown, S.A. 1996. Fluoroquinolones in animal health. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, 19, p. 1–14.

Cannon M, Harford S, Davies J. 1990. A comparative study on the inhibitory actions of chloramphenicol, thiamphenicol and some fluorinated derivatives. **J. Antimicrob. Chemother.**, 26, p. 307-17.

Carlsson, G.; Patringb, J.; Kreugerb, J.; Norrgrena, L.; Oskarsson, A. 2013. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aqu. Toxic.**, 126, p. 30– 41.

Carraschi, S.P., Shiogiri, N.S., Venturini, F.P., Cruz, C., Girio; A.C.F., Machado Neto, J.G. 2011. Acute toxicity and environmental risk of oxytetracycline and florfenicol antibiotics to Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Bol. Inst. Pesca**, 37(2), p. 115 - 122.

EMA 1998. Enrofloxacin. **European Medicines Agency**. Anexo I. Lista das denominações, forma farmacêutica, dosagem do medicamento veterinário, espécies animais, via de administração e requerente nos estados-membros, 10 p.

EMEA 2008. Toltrazuril. **European Medicines Agency**. Anexo I. Lista das denominações, forma farmacêutica, dosagem dos medicamentos veterinários, espécies animais, via(s) de administração, titulares das autorizações de introdução no mercado nos estados-membros, 10 p.

Ferreira, C.S.G.; Nunes, B.A.; Henriques-Almeida, J.M.M.; Guilhermino, L. 2007. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotox. Environ. Saf.**, 67, p. 452–458.

HSU, H. M.; BOWSER, P. R.; SCHACHTE, J.H.; SCARLETT, J. M. JR.; BABISH, J. G. 2007. Winter Winter Field Trials of Enrofloxacin for the Control of *Aeromonas salmonicida* Infection in Salmonids, **J. Wor. Aquac. Soc.**, 26(3), p. 307 – 314.

Jaafar, R.M.; Buchmann, K. 2011. Toltrazuril (Baycox<sup>®</sup>Vet.) in feed can reduce *Ichthyophthirius multifiliis* invasion of rainbow trout (Salmonidae). **Acta Ichth. Et. Pisc.**, 41 (1), p. 63–66.

Kunttu, H.M.T.; Valtonen, E.T.; Suomalainen, L.R., Vielma, J., Jokinen, I.E. 2009. The efficacy of two immunostimulants against *Flavobacterium columnare* infection in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellf. Imm.**, 26, p. 850–857.

Lima, A.C.N. 2004. Residualidade da oxitetraciclina no tecido do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (crustacea, decapoda) submetido a tratamento antibiótico. **Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências Marinhas**. Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE. 63 p.

Lui, Y.L.; Lu, C.P. 2004. Role of *Ichthyophthirius multifiliis* in the Infection of *Aeromonas hydrophila*. **J. Vet. Med. B.**, 51, p. 222–224.

Martinsen B, Horsberg TE, Varma KJ, et al.. 1993. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11 °C. **Aqu.**, 112, p. 1-11.

Mehlhorn, H.; Schmahl, G.; Haberkorn, A. 1988. Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. Short communication. **Parasitol. Res.**, 75, p. 64-66.

Novartis. **FISPQ- Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Agita 10 WG.** 5p., 2001. Disponível em: [http://www.novartis.com.br/\\_produtos/bulas/arq\\_1152\\_1876.pdf](http://www.novartis.com.br/_produtos/bulas/arq_1152_1876.pdf). Acesso em 14 de julho de 2011.

Schering-Plough Animal Health. 2009. Aquaflor. Florfenicol. **Technical Monograph for catfish health professionals**, 36 p.

Schmahl, G.; Mehlhorn, H. 1988. Treatment of fish parasites 2. Effects of sym. Triazinona (toltrazuril) on monogenea. **Parasitol. Res.**, 75, p.132-145.

Schmahl, G.; Mehlhorn, H.; Tarachewski, H. 1989. Treatment of fish parasites: Effects of sym. triazinone (toltrazuril) on skin parasitic Ciliophora (*Ichthyophthirius multifiliis* FOUQUET 1876, *Glossatella amoebae* GRENFELL 1884, and *Trichodina* spp. (EHRENBERG, 1831), **Eur. J. Protistol.**, 24, p. 152–161.

Schmahl, G.; Toukhy, E.L.A.; Ghaffar, F.A. 1990. Transmission electron microscopic studies on the effects of toltrazuril on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidida) infecting the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. **Parasitol Res.**, 76, p.700-706.

Syngenta. 2006. CRUISER 700WF. FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos, 7p.

Tomizawa, M.; Casida, M.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annu. Rev. Entomol.**, 48, p. 339-64.

Vargas, L. Souza, L.R., Ribeiro, R.P. 1998. Ocorrência de ectoparasitas em alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de Maringá. Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos. **Anais ENBRAPOA**, p.103.

Xu, D.H., Shoemaker, C. A., Klesius, P.H. 2007. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **J. Fish Dis.**, 30, p. 233–238.

## MANUSCRITO 1 - ECOTOXICIDADE DE FÁRMACOS E SUAS ASSOCIAÇÕES PARA ORGANISMO ALVO E NÃO ALVO

Silvia Patrícia Carraschi<sup>1,2\*</sup>; Taise Florêncio<sup>2</sup>; Nathália Garlich<sup>2</sup>; Claudinei da Cruz<sup>2,3</sup>; Maria José Tavares Ranzani-Paiva<sup>4</sup>; Robinson Antonio Pitelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Aquicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal. Via de Ac. Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/ nº, Zona Rural, Jaboticabal (SP), Brazil. CEP: 14884-900. Email: patycarraschi@gmail.com

<sup>2</sup>Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Campus Jaboticabal (SP), Brazil

<sup>3</sup>Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (Unifeb), Barretos (SP), Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Pesca de São Paulo, São Paulo (SP), Brazil

**Revista: Chemosphere** – Qualis A1 - ISSN: 0045-6535

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a toxicidade aguda do florfenicol (FFC), da enrofloxacin (ENRO), do toltrazuril (TOL), do thiamethoxan (TH) e das associações FFC+TH e ENRO+TOL para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), organismo alvo do tratamento, e para os bioindicadores, o peixe mato grosso (*Hypheosobrycon eques*), o caramujo (*Pomacea canaliculata*), a macrófita aquática (*Lemna minor*) e o microcrustáceo (*Daphnia magna*), além da interatividade das associações para os organismos teste. Para tanto, os organismos foram aclimatados em sala de bioensaio, submetidos inicialmente a testes de sensibilidade e nos ensaios definitivos expostos a concentrações nominais dos fármacos, em sistema estático. Para avaliação da interatividade das substâncias foi utilizada a CL50 de cada fármaco e da associação. A concentração letal (CL50) do FFC foi  $> 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$  para todos os organismos, exceto para a *L. minor* que foi  $97,03 \text{ mg.L}^{-1}$ . A ENRO apresentou CL50  $> 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$  para os dois peixes,  $14,64 \text{ mg.L}^{-1}$ , para o caramujo,  $60,49 \text{ mg.L}^{-1}$ , para a macrófita e  $84,39 \text{ mg.L}^{-1}$  para o microcrustáceo. O TOL apresentou CL50  $> 100 \text{ mg.L}^{-1}$  para *L. minor*,  $3,72$  para o pacu,  $6,22$  para o mato grosso,  $7,59 \text{ mg.L}^{-1}$  para o caramujo e  $18,57 \text{ mg.L}^{-1}$  para *D. magna*. O TH apresentou CL50  $> 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$  para a *L. minor* e *D. magna*,  $16,07 \text{ mg.L}^{-1}$  para o pacu,  $49,78 \text{ mg.L}^{-1}$ , mato grosso e  $87,14 \text{ mg.L}^{-1}$  para o caramujo. A associação FFC+TH apresentou toxicidade antagônica para o pacu, mato grosso,



macrófita e caramujo e sinérgica para o microcrustáceo. TOL+ENRO foi sinérgica para o pacu, para a macrófita, para o caramujo, para o microcrustáceo e antagônica para o mato grosso. A *L. minor* é o melhor bioindicador da toxicidade do FFC; o caramujo, para a ENRO e o mato grosso, para o TOL e do TH. Na prática do tratamento de doenças em pacu é importante cautela com a utilização da ENRO e do TH, pois causam alto risco ambiental.

**Palavras-chave:** bioindicador, quimioterápico, ecotoxicologia, antibiótico

## MANUSCRIPT 1 – DRUGS ECOTOXICITY AND YOURS ASSOCIATION FOR TARGET AND NON TARGET ORGANISMS

### Abstract

The aim this research were to evaluate the acute toxicity of florfenicol (FFC), enrofloxacin (ENRO), toltrazuril (TOL), thiamethoxan (TH) and of the associations FFC+TH and ENRO+TOL for pacu (*Piaractus mesopotamicus*), target organism of treatment, and for bioindicators, fish *Hyphessobrycon eques*, the snail *Pomacea canaliculata*, the plant *Lemna minor* and the microcrustacean *Daphnia magna* and to evaluate the associations interactivity. For this, the organisms were acclimated in bioassay room, were submitted first at sensibility tests and in the definitive tests were exposed at nominal concentrations from drugs, in static system. For chemical interactivity assessment was used the LC50 from each drug and from each association. Lethal concentration (LC50) from FFC was  $> 100.0 \text{ mg.L}^{-1}$  for organisms, except for *L. minor* that was  $97.03 \text{ mg.L}^{-1}$ . ENRO LC50 was  $> 100.0 \text{ mg.L}^{-1}$  for two fish,  $14.64 \text{ mg.L}^{-1}$ , for snail,  $60.49 \text{ mg.L}^{-1}$ , for plant and  $84.39 \text{ mg.L}^{-1}$  for microcrustacean. TOL showed LC50  $> 100 \text{ mg.L}^{-1}$  for *L. minor*,  $3.72$  for pacu,  $6.22$  for mato grosso,  $7.59 \text{ mg.L}^{-1}$  for snail and  $18.57 \text{ mg.L}^{-1}$  for *D. magna*. TH showed LC50  $> 100.0 \text{ mg.L}^{-1}$  for *L. minor* and *D. magna*,  $16.07 \text{ mg.L}^{-1}$  for pacu,  $49.78 \text{ mg.L}^{-1}$ , mato grosso and  $87.14 \text{ mg.L}^{-1}$  for snail. The association FFC+TH was antagonistic toxicity for pacu, mato grosso, plant and snail and synergistic for microcrustacean. TOL+ENRO was synergistic for pacu, plant, snail, and microcrustacean and antagonistic for mato grosso. *L. minor* is the best FFC bioindicator; snail, for ENRO and mato grosso, for TOL and TH. In disease treatment of pacu is importante take care in use of ENRO and TH, because cause high environmental risk.

**Keywords:** bioindicator, chemotherapy, ecotoxicology, antibiotic

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de fármacos na aquicultura no tratamento de doenças tem se tornado mais acentuada a cada ciclo de produção tanto em decorrência do aparecimento de novos patógenos introduzidos por espécies exóticas quanto pelo desenvolvimento de resistência e pela intensificação dos sistemas de produção.

Os fármacos na aquicultura requer uma sistemática para regulamentação e posterior comercialização, em que se inclui estudos toxicológicos para o organismo alvo e ecotoxicológicos para os organismos não alvos. Neste contexto, os ensaios de toxicidade aguda compõem a base da prospecção de uma molécula e possibilitam avaliar os efeitos nos organismos em um curto período de tempo, usando critérios de mortalidade para peixes e imobilidade para invertebrados (Zagatto e Bertoletti, 2008).

O florfenicol (FFC) é um antibiótico utilizado em vários países no controle de furunculose, colunariose (Inglis et al., 1991; USOFR, 2007) e aeromonose (Gaikowski et al., 2003; Seljestokken et al., 2006). A sua classificação como praticamente não tóxico para vários organismos, como *Onchorynchus mykiss*, *Lepomis macrochirus*, *Daphnia magna* e *Artemia parthenogenetica*, foi a principal característica que viabilizou seu estudo como fármaco na aquicultura (Ferreira et al., 2007; Schering-Plough, 2009). A enrofloxacin (ENRO) pertence ao grupo das quinolonas utilizada no controle de várias bactérias oportunistas (Intorre et al., 2000; Hsu et al., 2007). Em relação à sua toxicidade, é altamente tóxica para alga e planta aquática ( $CL_{50} > 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), praticamente não tóxica para microcrustáceo ( $CL_{50} > 100 \text{ g.L}^{-1}$ ) (Farma Base, 2011) e provavelmente pouco invasiva para os peixes (Robinson et al., 2005).

O toltrazuril (TOL) é um parasiticida eficaz no controle de *I. multifiliis*, microsporídeo, mixozoa, *Tricodina* spp (Mehlhorn et al., 1988; Shmahl et al., 1989) e monogenéticos (Schmahl e Mehlhorn, 1988). Os dados sobre a toxicidade deste fármaco o descreve como altamente tóxico para *O. mykiss* ( $CL_{50} < 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e moderadamente tóxica para *D. magna* ( $CL_{50} > 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Bayer, 2006).

O thiamethoxan (TH) é utilizado como inseticida, mas foi escolhido para ser prospectado no controle de *Anacanthorus penilabiatus* em pacu. Esse neonicotinóide é praticamente não tóxico para peixes, microcrustáceos e algas ( $CL_{50} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Novartis, 2001; Syngenta, 2006).

Os peixes são acometidos por uma variedade de patógenos, bactérias e parasitos, o que torna necessário o uso em conjunto de antibióticos e parasiticidas.

Porém não há estudos sobre a interação toxicológica que estes fármacos podem apresentar no ambiente e no organismo de criação.

Assim, tendo em vista a importância da prospecção de moléculas para uso na aquicultura, utilizando como base a avaliação toxicológica para organismos alvos e ecotoxicológica para os bioindicadores, objetivou-se: avaliar a toxicidade dos fármacos FFC, ENRO, TOL e TH e das associações FFC+TH e ENRO+TOL, para o pacu (*P. mesopotamicus*), organismo alvo do tratamento e para os bioindicadores: o peixe mato grosso (*H. eques*); o caramujo de água doce (*P. canaliculata*); a macrófita aquática *L. minor* e o microcrustáceo *D. magna*; avaliar a interatividade das associações para os organismos teste; avaliar a risco de intoxicação ambiental dos fármacos para os organismos teste; e classificar os fármacos, quanto à toxicidade aguda para os mesmos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, NEPEAM, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP, Campus de Jaboticabal.

Os fármacos utilizados foram as formulações comerciais: Baycox<sup>®</sup> (2,5 g de TOL.100 mL<sup>-1</sup>); Baytril<sup>®</sup> (10g ENRO. 100 mL<sup>-1</sup>) fornecidos pela Bayer<sup>®</sup> HealthCare; Agita<sup>®</sup> 10 WG (10g THI.100g<sup>-1</sup>) (Novartis<sup>®</sup> Animal Health) adquirido de forma comercial e o Aquaflo<sup>®</sup> (500g FFC.kg<sup>-1</sup>), fornecido pela MSD<sup>®</sup>.

### 2.1 Ensaio de toxicidade aguda para peixes

Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda foi utilizado pacu, *Piaractus mesopotamicus*, com peso entre 0,5 e 1,0 g (Figura 1B) e mato grosso entre 0,35 e 0,8 g (Figura 1C), aclimatados por dez dias em sala de bioensaio em caixas com capacidade de 250 L (Figura 1A). O sistema de aeração foi contínuo promovido por bombas de ar, temperatura a 25 ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas de luz e alimentados *ad libitum*, uma vez/dia, com ração comercial (2 a 3 mm, 40%PB).

Para avaliar a sanidade e a sensibilidade dos organismos teste foi realizado ensaio de toxicidade aguda, com a substância referência cloreto de potássio (KCl - 99,5% de pureza) (ABNT, 2011). Os ensaios foram realizados periodicamente, de acordo com a utilização de novos lotes de peixes, sendo a concentração letal média

(CL50;48h) de 1,54 g.L<sup>-1</sup>, com intervalo de confiança entre 1,28 e 1,86 g.L<sup>-1</sup> para o pacu e 2,20 g.L<sup>-1</sup> (1,84 - 2,67 g.L<sup>-1</sup>), para o mato grosso (carta referência do NEPEAM para estes organismos).

Em seguida, foram realizados ensaios preliminares com os fármacos e suas associações (50%/50%) para determinar os intervalos de concentração que as substâncias causam zero e 100% de mortalidade.

Com base no intervalo obtido, foram realizados os ensaios definitivos dos fármacos TOL, TH, FFC e ENRO e suas associações TOL+ENRO e TH+FFC (Tabela 1), com três réplicas, três peixes por réplica, na densidade máxima de 1g.L<sup>-1</sup>. Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água, isento de alimentação durante o período de exposição (48 horas). A avaliação da mortalidade foi diária com a retirada dos peixes mortos dos aquários (ABNT, 2011), sendo considerados neste estado os que não apresentavam batimento opercular, espasmos ou qualquer movimento durante observação visual por dois minutos.

**Tabela 1. Concentrações (mg.L<sup>-1</sup>) dos fármacos utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para os peixes.**

Fármacos	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> ) - Pacu	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> ) - Mato grosso
Enrofloxacina	0,0; 90,0; 105,0; 120,0; 135,0; 150,0	0,0; 100,0
Florfenicol	0,0; 100,0	0,0; 100,0
Toltrazuril	0,0; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0	0,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0
Thiametoxan	0,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0	0,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0
TOL+ENRO*	0,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0	0,0; 25,0; 35,0; 45,0; 55,0
TH+FFC*	0,0; 100,0	0,0; 100,0

\*TOL+ENRO: toltrazuril+ enrofloxacina; TH+FFC: thiamethoxan + florfenicol

Durante a realização dos ensaios foram analisadas as seguintes variáveis de qualidade da água: pH, oxigênio dissolvido (mg.L<sup>-1</sup>), temperatura (°C) e condutividade elétrica (ms.cm<sup>-1</sup>) em 0, 24 e 48 horas após a exposição.

Para o cálculo da concentração letal (CL50;48h) de cada fármaco e das associações foi utilizado o software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al.,1977).

## 2.2 Ensaios de toxicidade aguda para o caramujo *Pomacea canaliculata*

A norma utilizada foi ABNT (2011) para peixes, que foi adaptada para os ensaios com o caramujo, garantindo assim, a padronização dos resultados.

Os caramujos, com peso entre 1,0 e 2,0 g (Figura 1D), foram selecionados e aclimatados em sala de bioensaio (Figura 1E) à temperatura 25 ± 2°C, fotoperíodo de

12 horas claro/escuro, com sistema de aeração contínua, sendo alimentados diariamente com *Hydrilla verticillata* (Venturini et al., 2008).

Inicialmente foram realizados ensaios de sensibilidade com cloreto de potássio para a avaliação da sanidade dos lotes dos caramujos, com a concentração efetiva média (CE50;48h) de 1,49 g.L<sup>-1</sup> com limite inferior de 1,14 g.L<sup>-1</sup> e superior de 1,96 g.L<sup>-1</sup>, estando dentro dos valores da carta referência do NEPEAM para este organismo.

Após a determinação dos intervalos de concentração nos ensaios preliminares foram realizados os ensaios definitivos (Tabela 2).

**Tabela 2. Concentrações dos fármacos nos ensaios definitivos de toxicidade aguda com *Pomacea canaliculata*.**

<b>Fármacos</b>	<b>Concentrações (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Enrofloxacina	0,0; 1,0; 10,0; 25,0 e 50,0
Florfenicol	0,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0
Toltrazuril	0,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 13,0; 16,0 e 19,0
Thiametoxan	0,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0
TOL+ENRO*	0,0; 1,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0
TH+FFC*	0,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0

\*TOL+ENRO: toltrazuril+ enrofloxacina; TH+FFC: thiamethoxan + florfenicol

Durante a realização dos ensaios foram analisadas as seguintes variáveis de qualidade da água: pH, oxigênio dissolvido (mg.L<sup>-1</sup>), temperatura (°C) e condutividade elétrica (ms.cm<sup>-1</sup>) em 0, 24 e 48 horas após a exposição.

Para o cálculo da concentração efetiva (CE50;48h) de cada fármaco e das associações foi utilizado o software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al.,1977).

### **2.3. Toxicidade aguda para a macrófita aquática *Lemna minor***

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em caixas de 1 L (Figura 1F) e, após seu crescimento, transferidas para cristalizadores em meio de cultivo (Hoagland's) em sala de bioensaio (Figura 1G) com temperatura 25 ± 2° C, sob fotoperíodo/claro de 24 horas, por quatro dias (OECD, 2002).

As plantas foram desinfetadas em solução de hipoclorito a 0,5% e, em seguida, quatro colônias com três frondes foram selecionadas para cada repetição em recipientes com 50 mL de meio Hoagland's.

Inicialmente, para avaliação da sanidade do lote das plantas, foi realizado um ensaio com a substância referência cloreto de sódio (NaCl) em que a CL50;7d média

foi de  $6,67 \text{ g.L}^{-1}$ , com limite inferior de  $5,48 \text{ g.L}^{-1}$  e superior de  $6,85 \text{ g.L}^{-1}$ , estando dentro dos valores da carta de referência do NEPEAM para esse organismo teste.

Após a determinação do intervalo de concentração nos ensaios preliminares foram realizados os ensaios definitivos (Tabela 3).

**Tabela 3. Concentrações dos fármacos utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda com *Lemna minor*.**

Fármacos	Concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
Enrofloxacina	0,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0
Florfenicol	0,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0
Toltrazuril	0,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0
Thiametoxan	0,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0
TOL+ENRO*	0,0; 0,1; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0
TH+FFC*	0,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0

\*TOL+ENRO: toltrazuril+ enrofloxacina; TH+FFC: thiamethoxan + florfenicol

Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, com três réplicas em cada concentração, com duração de sete dias de exposição. Os ensaios foram avaliados nos 3º, 5º e 7º dia após a exposição e observados o aumento do número de frondes, clorose (perda de clorofila) e necrose (morte das plantas).

Para o cálculo da CL50;7d de cada fármaco e das associações foi utilizado o software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al.,1977).

#### 2.4 Toxicidade aguda para o microcrustáceo *Daphnia magna*

Os ensaios com o microcrustáceo foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional (Laborseg) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal.

Os organismos foram cultivados em cristalizadores de 2,0 L de capacidade (Figura 1H), com o meio de cultivo renovado completamente duas vezes por semana (ABNT, 2009).

A alimentação da cultura foi composta por uma suspensão de algas da espécie *Scenedesmus subspicatus* na concentração aproximada de  $5 \times 10^6$  células/indivíduo/dia e alimento composto constituído por solução de ração fermentada para peixes ornamentais e solução de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

Os cristalizadores foram mantidos em estufas em temperatura controlada de  $20 \pm 2^\circ \text{ C}$ , intensidade luminosa de aproximadamente 3.000 lux e fotoperíodo de 8 horas de escuro e 16 horas de luz.

Os neonatos, apresentando de 4 a 24 h de vida, foram selecionados e distribuídos cinco em cada repetição (Figura 11). A sanidade do lote dos organismos teste foi avaliada utilizando o cloreto de sódio como substância referência, com CE50;48h média de 4,31 g.L<sup>-1</sup>, estando dentro dos valores da carta referência do Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional do Laborseg.

Para os ensaios definitivos (Tabela 4) foram utilizadas quatro réplicas para cada concentração com duração de 48 h.

**Tabela 4. Concentrações dos fármacos utilizadas nos ensaios definitivos de toxicidade aguda para *Daphnia magna*.**

Fármacos	Concentrações (mg.L <sup>-1</sup> )
Enrofloxacina	0,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0
Florfenicol	0,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0
Toltrazuril	0,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 75,0
Thiametoxan	0,0; 10,0; 50,0; 100,0 e 200,0
TOL+ENRO*	0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30; 35,0
TH+FFC*	0,0; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0

\*TOL+ENRO: toltrazuril+ enrofloxacina; TH+FFC: thiametoxan + florfenicol

Para o cálculo da CE50;48h de cada fármaco e das associações foi utilizado o software Trimmed Spearman Karber (Hamilton et al.,1977).

## 2.5 Interatividade das substâncias das associações

As associações foram compostas de 50% de cada fármaco e após a obtenção das CL/CE50 de cada fármaco individualmente e das associações foi utilizado o modelo descrito por Marking (1977) em que expressa a soma das diferentes substâncias (S) e o índice de aditividade (IA) das mesmas, como descritos a seguir:

$$S = (A_m / A_i) + (B_m / B_i), \text{ sendo:}$$

S = soma da aditividade;

A<sub>m</sub> = concentração da substância A na associação que causa 50% de efeito;

B<sub>m</sub> = concentração da substância B na associação que causa 50% de efeito;

A<sub>i</sub> = concentração da substância A que, isolada causa 50% de efeito (CL/CE50);

B<sub>i</sub> = concentração da substância B que, isolada causa 50% de efeito (CL/CE50).

Portanto, pela soma (S) é possível determinar o efeito interativo das substâncias, caracterizado por:

S > 1, o efeito da associação é menos que aditivo (antagônico);

S = 1, o efeito é aditivo;



$S < 1$ , o efeito é mais que aditivo (sinérgico).

Assim, com a soma obtida é possível calcular o índice de aditividade (IA) da associação das substâncias, pela fórmula:

$$\text{Se } S > 1 \rightarrow \text{IA} = S(-1) + 1$$

$$\text{Se } S < 1 \rightarrow \text{IA} = 1/S - 1$$

Com o IA é possível conhecer quantas vezes a associação é mais ou menos tóxica, do que a soma da toxicidade dos fármacos individualmente.

## **2.6 Risco de intoxicação ambiental dos fármacos para os organismos teste**

O risco (RQ) é a combinação da exposição e da toxicidade do xenobiótico e foi calculado utilizando a razão entre a concentração ambiental estimada (CAE), que é a concentração/dose do fármaco utilizada no campo no tratamento, e a concentração letal CL50, obtida nos ensaios de toxicidade aguda. O valor do Q, também denominado de quociente de risco (RQ), é um número puro, pois as unidades dos parâmetros se anulam a divisão (Goktepe et al.,2004), sendo as classes de risco:  $\text{RQ} > 0,5 =$  Alto risco;  $0,05 < \text{RQ} < 0,5 =$  Médio risco e  $\text{RQ} < 0,05 =$  Baixo risco.

A CAE de cada fármaco foi considerada com base na concentração que apresentou melhor eficácia de controle dos parasitos neste trabalho: FFC:  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; ENRO:  $90,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; TOL:  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  e TH:  $75 \text{ mg.L}^{-1}$ , que poderão ser verificadas no próximo capítulo 2.



**Figura 1.** Organismos teste utilizados nos ensaios de toxicidade aguda. A. Caixa de aclimação dos peixes. B. Exemplar de *Piaractus mesopotamicus*. C. Seleção de *Hyphessobrycon eques*. D. Exemplar de *Pomacea canaliculata*. E. Caixa de aclimação de *P. canaliculata*. F. Caixas de cultivo de *Lemna minor*. G. Aclimação de *L. minor* em sala de bioensaio. H. Cristalizadores em que são cultivados os microcrustáceos *Daphnia magna*. I. Tubo de 15 mL que compõe cada réplica utilizada no ensaio de toxicidade aguda com *D. magna*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Toxicidade aguda para o organismo alvo *Piaractus mesopotamicus*

A CL(I)50;48h estimada do FFC foi maior que  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , pois esse antibiótico não causou mortalidade nas concentrações testadas, sendo classificado como praticamente não tóxico ( $\text{CL}_{50} > 100,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) (Zucker, 1985) para o pacu. Os peixes demonstraram agitação e aumento do batimento opercular somente logo após a aplicação (0 hora).

A CL50;48h estimada do antibiótico ENRO foi de  $116,70 \text{ mg.L}^{-1}$  (Tabela 5) sendo classificada como praticamente não tóxico ( $\text{CL}_{50} > 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle não ocorreu mortalidade, em  $90,0 \text{ mg.L}^{-1}$  a mortalidade média foi de 16,56%,

em 105,0 mg.L<sup>-1</sup>, 27,72%, em 120,0 mg.L<sup>-1</sup>, 44,67%, em 135,0 mg.L<sup>-1</sup>, 88,94% e em 150,0 mg.L<sup>-1</sup>, 100%.

Em zero e 24 horas após a exposição à ENRO, os peixes apresentaram aumento do batimento opercular e agitação e em 48 horas após, os expostos às maiores concentrações (120 e 135 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram espasmos musculares, com permanência na parte inferior do aquário.

A CL<sub>50;48h</sub> do TOL foi 3,72 mg.L<sup>-1</sup>, sendo classificado como moderadamente tóxico (1,0 < CL 50 < 10,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle não ocorreu mortalidade; em 3,0 mg.L<sup>-1</sup> esta média foi de 7,33%, em 3,5, 48,33%, 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, 44,33%, 4,5 mg.L<sup>-1</sup>, 100% e em 5,0 mg.L<sup>-1</sup>, 92,67% (Tabela 5).

Os peixes expostos a 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de TOL demonstraram sinais clínicos de intoxicação em 24 e 48 horas após a exposição, como natação errática, perda da capacidade de arfagem, letargia, espasmos e diminuição do batimento opercular.

A CL<sub>50;48h</sub> do TH foi 16,97 mg.L<sup>-1</sup>, sendo classificado como pouco tóxico (10,0 < CL 50 < 100,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle não ocorreu mortalidade; no entanto em 10,0 mg.L<sup>-1</sup> foi de 22,0%, em 15,0, 37,0%, 20,0 mg.L<sup>-1</sup>, 52,0%, 25,0 mg.L<sup>-1</sup>, 66,67%, 30,0 mg.L<sup>-1</sup>, 85,30% e em 35 mg.L<sup>-1</sup>, 100% (Tabela 5).

Os peixes expostos ao TH demonstraram sinais clínicos de intoxicação 24 e 48 horas após a exposição: prolapso labial e presença na parte superior do aquário na tentativa de captar o oxigênio presente na interface água-ar. A presença na superfície da água é característica de baixa concentração de oxigênio dissolvido (Carraschi et al., 2011a). Neste caso, o TH causou esta diminuição, pois foi encontrada concentração < 1,0 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 5).

A CL<sub>50;48h</sub> estimada da associação TOL+EF foi 16,15 mg.L<sup>-1</sup>, sendo classificada como pouco tóxica (10,0 < CL 50 < 100,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle e em 10,0 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu mortalidade; em 15,0 mg.L<sup>-1</sup> foi de 33,33%, 20,0, 83,33% e em 25 mg.L<sup>-1</sup>, foi de 100%

Após 24 e 48 horas os animais expostos a 15,0; 20,0 e 25,0 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram natação errática, perda da capacidade de arfagem, diminuição do batimento opercular, espasmos, letargia e tremor.

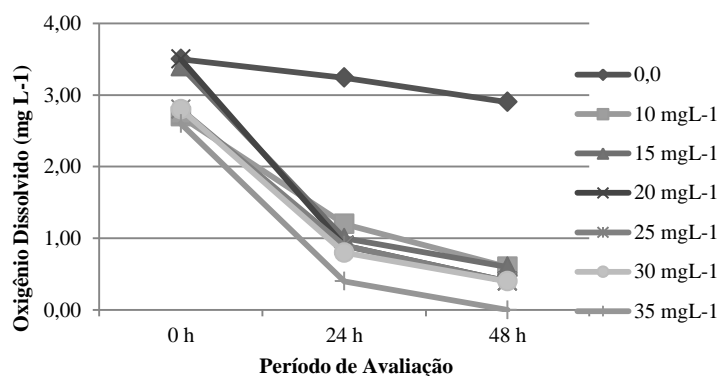
A CL<sub>50;48h</sub> estimada da associação TH+FFC foi > 100,0 mg.L<sup>-1</sup> sendo classificada como praticamente não tóxica (CL 50 < 100,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985).

**Tabela 5** Concentração letal (CL50;48h) dos fármacos e suas associações para *Piaractus mesopotamicus*.

Fármacos	Limite Superior	CL50;48h (mg.L <sup>-1</sup> )	Limite Inferior	Equação Linear	R <sup>2</sup>
Florfenicol	-	>100	-	-	-
Enrofloxacin	125,89	116,70	108,19	y = 1,520x - 126,90	0,95
Toltrazuril	4,02	3,72	3,45	y = 44,47x - 119,35	0,85
Thiamethoxan	29,49	16,97	11,00	y = 3,140x - 10,163	0,99
TOL+ENRO	18,22	16,15	15,35	y = 7x - 68.333	0,97
TH+FFC	-	>100	-	-	-

- não calculado

O FFC, a ENRO, o TOL e as associações não alteraram as variáveis físicas e químicas da água em que a temperatura ficou entre 27 e 28 °C; oxigênio dissolvido > 4,0 mg.L<sup>-1</sup>; o pH entre 7,0 e 8,0 e a condutividade entre 170 e 180 µS.cm<sup>-1</sup>, estando dentro dos valores preconizados pela ABNT (2011) para início dos ensaios de toxicidade. O TH diminuiu o O<sub>2</sub>D que variou de 3,11 mg.L<sup>-1</sup> no controle para 1,50 mg.L<sup>-1</sup> em 35,0 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que nesta concentração, após 24 horas de exposição, apresentou 0,40 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Oxigênio dissolvido durante ensaio de toxicidade aguda do TH para o pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

A sobrevivência do pacu em baixas concentrações de oxigênio como verificado nos ensaios com TH, é atribuída ao fato de ser uma espécie do Pantanal Sul Americano que sobrevive em diversas concentrações de oxigênio que se alteram em pulsos de inundação, suportando concentrações menores que 1,0 mg.L<sup>-1</sup> (Bastos et al., 2007). Essa espécie apresenta adaptação a local com baixo oxigênio disponível, conseguindo captar oxigênio na interface água-ar por meio de expansão do lábio inferior (prolapso labial). Essa adaptação foi observada nos pacus durante exposição

ao TH, demonstrando uma forma que os peixes encontraram para sobreviver nas condições adversas a nível de oxigênio na água, causada pela diluição do TH. Portanto este comportamento parece ser devido à baixa concentração de oxigênio na água e não por uma alteração direta do TH a nível celular nas lamelas branquiais.

Em relação à toxicidade do FFC, este antibiótico também foi praticamente não tóxico para os peixes *O. mykiss* (CL50;48h > 780,0 mg.L<sup>-1</sup>) e *Lepomis macrochirus* (CL50;48h > 830,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Schering-Plough, 2009).

Em relação à EF, efeitos adversos somente foram observados quando a concentração excedeu 10 vezes a recomendada para tratamento (Robinson et al., 2005). A ENRO também foi praticamente não tóxica para o peixe *Leuciscus idus* (CL50;96h > 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Farma Base, 2011).

O TOL foi mais tóxico para o *P. mesopotamicus* e não causou toxicidade para *L. minor*. Portanto o TOL não causa fitotoxicidade em plantas, porém a CE50 para alga *Selenastrum capricornutum* é de 3,16 mg.L<sup>-1</sup> (Rojickova et al., 1998).

TH e organofosforados apresentam modo de ação similares nas sinapses nervosas, e peixes neotropicais como *P. mesopotamicus* são sensíveis a estes compostos, como verificado com triclorfon (CL50;96h de 0,19 mg.L<sup>-1</sup>) (Mataqueiro, et al., 2008).

O TH é menos tóxico para *D. magna* do que os neonicotinóides guadipyr (CE50;48h de 13,01 mg.L<sup>-1</sup>) (Qi et al., 2013) e imidacloprid (CE50;48h de 10,44 mg.L<sup>-1</sup>) (Song et al., 1997). O TH é mais tóxico para *P. mesopotamicus* e *H. eques* do que para *Lepomis macrochirus* (CL50;96h > 114,0 mg.L<sup>-1</sup>) e *O. mykiss* (CL50;96h > 100,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Barbee e Stout, 2009).

Assim, os antibióticos FFC e ENRO foram menos tóxicos que os ectoparasiticidas TOL e THI para o pacu. Devido à prática do uso dos parasiticidas ser em banho terapêutico, ou seja, com uma maior exposição dos peixes de forma direta, é necessário cuidado com a concentração e o tempo de exposição quando utilizados no tratamento de doenças em *P. mesopotamicus*.

### **3.2 Toxicidade aguda para os organismos bioindicadores**

#### **3.2.1 *Hyphessobrycon eques***

A CL50;7d do FFC, da ENRO e da associação FFC+TH foi maior que 100 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 6), sendo classificado como praticamente não tóxico (10 < CL50 < 100 mg.L<sup>-1</sup>)

(Zucker, 1985) para o mato grosso, pois não ocorreu mortalidade nas concentrações avaliadas.

A CL50;48h do TOL foi 6,22 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 6), sendo classificado como moderadamente tóxico ( $1 < CL50 < 10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle e em 4,0 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu mortalidade, em 6,0 mg.L<sup>-1</sup> a mortalidade foi de 56%, 8,0, 67% e em 10,0 mg.L<sup>-1</sup>, 100% (Tabela 6).

A CL50;48h do TH foi 49,78 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 6), sendo classificado como pouco tóxico ( $10 < CL50 < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle e em 20 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu mortalidade, em 40,0 mg.L<sup>-1</sup> a mortalidade foi de 11,11%, 60,0, 77,78% e em 80 mg.L<sup>-1</sup>, 100% (Tabela 6).

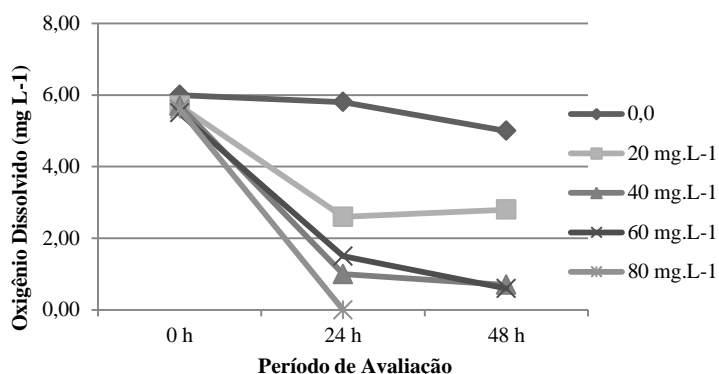
A CL50;48h da associação TOL+EF foi 37,92 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 6), sendo classificada como pouco tóxica ( $10 < CL50 < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle e em 25 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu mortalidade, em 35,0 e 45,0 mg.L<sup>-1</sup> a mortalidade foi de 55,56% e em 55 mg.L<sup>-1</sup>, 100% (Tabela 6).

**Tabela 6. Concentração letal (CL50;48h) dos fármacos e suas associações para o *Hyphessobrycon eques*.**

Fármacos	Limite Superior	CL50;48h (mg.L <sup>-1</sup> )	Limite Inferior	Equação Linear	R <sup>2</sup>
Florfenicol	-	>100	-	-	-
Enrofloxacina	-	>100	-	-	-
Toltrazuril	5,41	6,22	7,16	$y = 15,55x - 53,1$	0,93
Thiamethoxan	42,82	49,78	57,83	$y = 1,8334x - 44,5$	0,93
TOL+ENRO*	30,60	37,92	46,99	$y = 2,3334x - 46,111$	0,82
TH+FFC*	-	>100	-	-	-

- não calculado, \*TOL+ENRO: toltrazuril+ enrofloxacina; TH+FFC: thiamethoxan + florfenicol

O FFC, a EF, o TOL e as associações não alteraram as variáveis físicas e químicas da água durante os ensaios com o mato grosso, com valores dentro dos preconizados pela ABNT (2011) para início dos ensaios de toxicidade. O TH causou diminuição do O<sub>2</sub>D, variando de 5,6 mg.L<sup>-1</sup> no controle, para 2,30 mg.L<sup>-1</sup> em 60,0 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que nesta concentração, após 48 horas de exposição, o oxigênio apresentou 0,60 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 3). Em 80,0 mg.L<sup>-1</sup> com 24 horas de exposição ocorreu 100% de mortalidade somente sendo possível aferir as variáveis da água em 0 hora.



**Figura 3.** Oxigênio dissolvido durante ensaio de toxicidade aguda do TH para o mato grosso, *Hyphessobrycon eques*.

### 3.2.2 Toxicidade para *Pomacea canaliculata*

A CE50;48h do FFC foi  $> 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$  (Tabela 7), sendo classificado como praticamente não tóxico ( $10 < \text{CL}_{50} < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle, em 60 e 70  $\text{mg.L}^{-1}$  não ocorreu imobilidade, em 80,0  $\text{mg.L}^{-1}$  ocorreu 13,3% de imobilidade e em 90,0 e 100,0  $\text{mg.L}^{-1}$ , 6,7%, não respondendo de forma linear à exposição.

A CE50;48h da EF foi 14,64  $\text{mg.L}^{-1}$  (Tabela 7), sendo classificada como pouco tóxica ( $10 < \text{CL}_{50} < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle não ocorreu imobilidade, em 1,0  $\text{mg.L}^{-1}$  a imobilidade foi de 20%; em 10,0 e em 25,0, 40% e em 100,0  $\text{mg.L}^{-1}$ , 100%.

A CE50;48h do TOL foi 7,59  $\text{mg.L}^{-1}$  (Tabela 7), sendo classificado como moderadamente tóxico ( $1 < \text{CL}_{50} < 10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle não ocorreu imobilidade, em 3,0  $\text{mg.L}^{-1}$  ocorreu 6,7% de imobilidade, 5,0, 33,33%, 7,0, 40%, 10,0, 60%, 13,0, 80%, 16, 86,7% e em 19,0  $\text{mg.L}^{-1}$ , 100%.

A CE50;48h do TH foi 87,14  $\text{mg.L}^{-1}$  (Tabela 7), sendo classificado como pouco tóxico ( $10 < \text{CL}_{50} < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle não ocorreu imobilidade, em 70,0  $\text{mg.L}^{-1}$  a imobilidade foi de 13,0%; 80,0, 33,33%, 90,0, 47% e em 100  $\text{mg.L}^{-1}$ , 87%.

A CE50;48h da associação TOL+EF foi 12,34  $\text{mg.L}^{-1}$  (Tabela 7), sendo classificada como pouco tóxica ( $10 < \text{CL}_{50} < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle não ocorreu imobilidade, em 1,0  $\text{mg.L}^{-1}$  a imobilidade foi de 6,7%, 10,0, 33,33%, 25,0, 66,7%, 50,0, 93,3% e em 100  $\text{mg.L}^{-1}$ , 100%.

A CL50;48h da associação TH+FFC foi  $> 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$  (Tabela 7), sendo classificada como praticamente não tóxica ( $\text{CL}_{50} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No

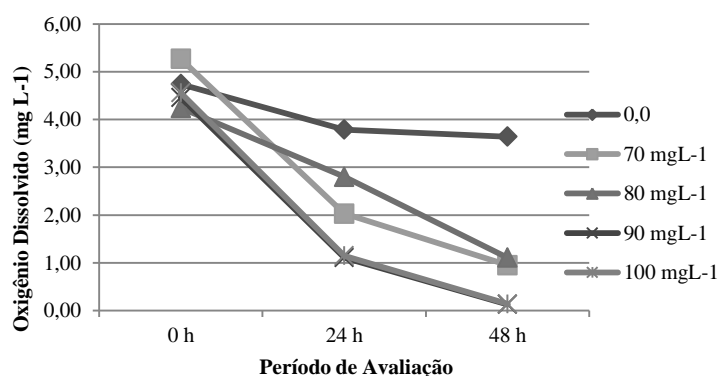
controle não ocorreu imobilidade, em 60,0 mg.L<sup>-1</sup> a imobilidade foi de 13,3%, 70,0, 20,0%, 80,0, 13,3%, 90,0, 20,0% e em 100 mg.L<sup>-1</sup>, 20%.

**Tabela 7. Concentração efetiva (CE50;48h) dos fármacos e suas associações para *Pomacea canaliculata***

Fármacos	Limite Superior	CE50;48h (mg.L <sup>-1</sup> )	Limite Inferior	Equação Linear	R <sup>2</sup>
Florfenicol	-	> 100	-	y = 0,20x - 10,74	0,33
Enrofloxacina	34,24	14,64	6,26	y = 1,53x + 16,89	0,91
Toltrazuril	9,23	7,59	6,24	y = 5,54x + 0,23	0,96
Thiamethoxan	92,60	87,14	82,00	y = 2.36x - 155.6	0,95
TOL+ENRO*	21,10	12,34	7,22	y = 0.87x + 27.487	0,76
TH+FFC*	-	> 100,0	-	y = 0,13x + 6,6	0,33

\*TOL+ENRO: toltrazuril+ enrofloxacina; TH+FFC: thiamethoxan + florfenicol

O FFC, a EF, o TOL e as associações não alteraram as variáveis físicas e químicas da água durante ensaio com o caramujo (ABNT, 2011) para início dos ensaios de toxicidade. O TH diminuiu o O<sub>2</sub>D da água, variando de 4,06 mg.L<sup>-1</sup> no controle para 1,95 mg.L<sup>-1</sup> em 100,0 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que nesta concentração, após 24 horas de exposição, o valor foi de 0,14 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Oxigênio dissolvido durante ensaio de toxicidade aguda do TH para o caramujo, *Pomacea canaliculata*.

A diminuição do oxigênio dissolvido observada nos ensaios do TH com pacu, mato grosso e caramujo é atribuída à ação do fármaco e também ao consumo de oxigênio dos organismos teste. Como o pacu é um peixe com um metabolismo mais rápido e também apresentou um tamanho maior que os demais organismos durante os



ensaios, a sua contribuição no decréscimo do oxigênio também é maior do que nos ensaios com mato grosso e caramujo.

Isto é importante, pois o TH poderá ser utilizado no tratamento de doença na forma de banho terapêutico em pacu e a diminuição do oxigênio da água pode prejudicar sua sobrevivência. Vale ressaltar também que peixes maiores e maiores densidades aumentam o consumo de oxigênio o que pode prejudicar a eficácia do fármaco e o sucesso na produtividade do ciclo de criação.

### 3.2.3 Toxicidade para *Lemna minor*

A CL<sub>50</sub>;7d do florfenicol (FFC) foi 97,03 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 8), sendo classificado como pouco tóxico (10 < CL<sub>50</sub> < 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle não foram observadas frondes necróticas e cloróticas, porém as plantas expostas a 60,0 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram 34% das frondes cloróticas, em 70,0, 43%, 80,0, 44%, 90,0, 45% e em 100,0 mg.L<sup>-1</sup>, 52% .

A CL<sub>50</sub>;7d da enrofloxacin (EF) foi 60,49 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 8), sendo classificada como pouco tóxica (10 < CL<sub>50</sub> < 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle não ocorreram as referidas alterações, porém as plantas expostas a 60,0 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram 45% de frondes cloróticas, 70,0, 59%, 80,0, 62%, 90,0, 66% e em 100,0 mg.L<sup>-1</sup>, 84%.

A CL<sub>50</sub>;7d do toltrazuril (TOL) foi > 100,0 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 8) pois não ocorreu no mínimo 50% de frondes cloróticas e/ou necróticas, sendo classificado como praticamente não tóxico (CL<sub>50</sub> > 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle não foram observadas quaisquer alteração, entretanto as plantas expostas a 60,0 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram 26% de frondes doentes, 70,0, 28%, 80,0, 32%, 90,0, 35% e em 100,0 mg.L<sup>-1</sup>, 49%.

A CL<sub>50</sub>;7d do thiamethoxan (TH) foi > 100,0 mg.L<sup>-1</sup> pois não ocorreu no mínimo 50% de frondes cloróticas e/ou necróticas (Tabela 8), sendo classificado como praticamente não tóxico (CL<sub>50</sub> > 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle não foram observadas frondes doentes, em 10,0 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu 18,52% de frondes doentes; 25,0, 35,80%, 50,0, 33,33%, 75,0, 29,69% e em 100,0 mg.L<sup>-1</sup>, 44,44%.

A CL<sub>50</sub>;7d da associação TOL+EF foi 7,03 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 8), sendo classificada como moderadamente tóxica (1,0 < CL<sub>50</sub> < 10 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle não

ocorreram frondes doentes, em 0,1 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu 33% de frondes doentes; 10,0, 51%, 20,0, 52%, 40,0, 53%, 60, 60%, 80,0 e em 100,0 mg.L<sup>-1</sup>, 65%.

A CL50;7d da associação TH+FFC foi > 100,0 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 8), não apresentando no mínimo 50% de mortalidade para ser possível o cálculo da CL50 pelo software, sendo classificada como praticamente não tóxica (CL50 > 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle não foram observadas frondes doentes, em 60,0 mg.L<sup>-1</sup> ocorreu 31% de frondes doentes; 70,0, 37%, 80,0, 32%, 90,0, 47% e 100,0 mg.L<sup>-1</sup>, 49%.

**Tabela 8. Concentração letal (CL50;7d) dos fármacos e suas associações para o bioindicador *Lemna minor*.**

Fármacos	Limite Superior	CL50;7d (mg.L <sup>-1</sup> )	Limite Inferior	Equação Linear	R <sup>2</sup>
Florfenicol	108,93	97,03	86,44	y = 1.2785x + 34.612	0,90
Enrofloxacin	70,56	60,49	51,86	y = 2,7907x + 43,721	0,91
Toltrazuril	-	>100	-	y = 1.7886x + 21.382	0,87
Thiamethoxan	-	>100	-	y = 2,4103x + 6,4668	0,74
TOL+ENRO*	20,93	7,03	2,36	y = 1,5925x + 38,064	0,85
TH+FFC*	-	>100	-	y = 1.5196x + 28,480	0,77

- não calculado, \*TOL+ENRO: toltrazuril+ enrofloxacin; TH+FFC: thiamethoxan + florfenicol

### 3.2.4. *Daphnia magna*

A CE50;48h do FFC foi > 100,0 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 9), pois não ocorreu imobilidade dos neonatos em concentrações até 100 mg.L<sup>-1</sup>; sendo classificado como praticamente não tóxico (CL50 > 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985).

A CE50;48h da EF foi 84,39 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 9), sendo classificado como pouco tóxico (10 < CL50 < 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle e em 25 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu imobilidade, em 50,0 mg.L<sup>-1</sup> foi de 30,0%, 75,0, 75,0% e 100 mg.L<sup>-1</sup>, 90%.

A CE50;48h do TOL foi 18,57 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 9), sendo classificado como pouco tóxico (10 < CL50 < 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle e em 10 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu imobilidade, em 25,0 mg.L<sup>-1</sup> foi de 80,0% e em 50 mg.L<sup>-1</sup>, 100%.

A CE50;48h do TH foi 107,18 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 9), sendo classificado como praticamente não tóxico (CL50 > 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Zucker, 1985). No controle e em 50 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu imobilidade, em 100,0 mg.L<sup>-1</sup> foi de 40,0% e em 200 mg.L<sup>-1</sup>, 100%.

A CE50;48h da associação TOL+EF foi 23,51mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 9), sendo classificada como pouco tóxica ( $10 < CL50 < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle não ocorreu imobilidade, em 5,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup> foi de 5,0%, 15,0, 15,0%, 20,0 e 15,0, 20,0%, 30,0, 60,0% e em 35 mg.L<sup>-1</sup>, 90%.

A CE50;48h da associação TH+FFC foi 14,57 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 9), sendo classificada como pouco tóxica ( $10 < CL50 < 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Zucker, 1985). No controle e em 1,0 mg.L<sup>-1</sup> não ocorreu imobilidade, em 3,0 mg.L<sup>-1</sup> foi de 15,0%, 5,0, 20,0%, 10,0, 25,0%, 20,0, 40,0%, 30, 65,0% e em 40 mg.L<sup>-1</sup>, 100%.

**Tabela 9. Concentração efetiva (CE50;48h) dos fármacos e suas associações para o biondicador *Daphnia magna*.**

Fármacos	Limite Superior	CE50;48h (mg.L <sup>-1</sup> )	Limite Inferior	Equação Linear	R <sup>2</sup>
Florfenicol	-	> 100	-	-	-
Enrofloxacina	130,88	84,39	54,42	$y = 1,26x - 30$	0,97
Toltrazuril	21,45	18,57	16,08	$y = 2,32x - 5,91$	0,79
Thiamethoxan	124,75	107,18	92,08	$y = 0,65x - 30$	0,99
TOL+ENRO*	26,47	23,51	20,88	$y = 2,82x - 18,57$	0,93
TH+FFC*	18,97	14,57	11,34	$y = 2,25x + 2,72$	0,92

\*TOL+ENRO: toltrazuril+ enrofloxacina; TH+FFC: thiamethoxan + florfenicol

### 3.3. Interatividade das associações

A associação TOL+ENRO apresentou toxicidade sinérgica ( $S < 1$ ) para *P. mesopotamicus*, *L. minor*, *P. canaliculata* e *D. magna* e antagônica ( $S > 1$ ) para o *H. eques*. A associação FFC+THI foi antagônica ( $S > 1$ ) para a macrófita, caramujo, pacu e mato grosso e sinérgica ( $S < 1$ ) para *D. magna* (Tabela 10).

Dessa forma, a toxicidade da associação TOL+ENRO é 0,03, 8,43, 0,01 e 1,12 vezes maior para o pacu, para a macrófita, para o caramujo e para o microcrustáceo, respectivamente, do que a toxicidade de cada fármaco isoladamente e 0,52 vezes menor, para o mato grosso, do que cada fármaco isolado.

A toxicidade da associação FFC+TH é 0,81; 0,1; 0,22 e 0,16 vezes menor para o pacu, para a macrófita, para o caramujo e para o mato grosso, respectivamente, do que cada fármaco isoladamente e 19,83 vezes maior para *D. magna* do que cada fármaco isoladamente (Tabela 10).

De forma geral a associação TOL+ENRO deve ser utilizada com mais cautela visto que a presença dos dois fármacos em conjunto apresenta toxicidade sinérgica para os organismos não alvos.

**Tabela 10.** Avaliação da Soma (S) e do Índice de Aditividade (IA) das associações utilizadas nos ensaios de toxicidade aguda para os organismos teste.

Organismos teste	Toltrazuril+Enrofloxacina		Florfenicol+Thiamethoxan	
	S	IA	S	IA
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	0,98	0,02	1,81	-0,81
<i>Lemna minor</i>	0,106	8,43	1,01	-0,1
<i>Pomacea canaliculata</i>	0,99	0,01	1,02	-0,2
<i>Daphnia magna</i>	0,47	1,12	0,048	19,83
<i>Hyphessobrycon eques</i>	1,52	-0,52	1,16	-0,16

### 3.4 Risco ambiental dos fármacos

Para o cálculo do risco ambiental, os fármacos que apresentaram CL/CE50 > 100 mg.L<sup>-1</sup>, foram considerados com a CL ou CE como sendo 100 mg.L<sup>-1</sup>.

A ENRO e o TH causam alto risco de intoxicação ambiental para todos os organismos teste, pois a CL/CE50 é próxima ou inferior à CAE, ou seja, a concentração capaz de causar letalidade ou imobilidade é próxima ou inferior à indicada para o tratamento de doenças de peixes. O TOL e FFC apresentam médio ou baixo risco para os organismos (Tabela 11), pois a CL ou CE50 está mais distante da CAE.

**Tabela 11.** Risco de intoxicação ambiental dos fármacos para os organismos teste.

<i>Lemna minor</i>	Florfenicol	Enrofloxacin	Toltrazuril	Thiamethoxan
CAE	10,0 mg.kg <sup>-1</sup>	90,0 mg.kg <sup>-1</sup>	1,0 mg.L <sup>-1</sup>	75,0 mg.L <sup>-1</sup>
CL50 (mg.L <sup>-1</sup> )	97,03	60,49	100,0	100,0
Razão	0,10	1,48	0,01	0,75
Risco	Médio	Alto	Baixo	Alto
<i>Pomacea canaliculata</i>				
CE50 (mg.L <sup>-1</sup> )	100,0	14,64	7,59	87,14
Razão	0,1	6,14	0,13	0,86
Risco	Médio	Alto	Médio	Alto
<i>Daphnia magna</i>				
CE50 (mg.L <sup>-1</sup> )	100	84,39	18,57	107,18
Razão	0,1	1,06	0,05	0,69
Risco	Médio	Alto	Médio	Alto
<i>Hyphessobrycon eques</i>				
CL50 (mg.L <sup>-1</sup> )	100,0	100,0	6,22	49,78
Razão	0,1	0,9	0,16	1,50
Risco	Médio	Alto	Médio	Alto
<i>Piaractus mesopotamicus</i>				
CL50 (mg.L <sup>-1</sup> )	100,0	116,7	3,72	16,97
Razão	0,1	0,77	0,27	4,42
Risco	Médio	Alto	Médio	Alto

CAE: concentração ambiental estimada

O FFC foi o fármaco menos tóxico para todos os bioindicadores e também foi praticamente não tóxico para *D. magna* (CL50;48h > 330,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Schering-Plough, 2009) e *A. parthenogenetica* (CL50;48h > 889,0 mg.L<sup>-1</sup>) (Ferreira et al.,2007). O FFC também não causa risco de intoxicação para *O. mykiss*, *L. macrochirus*, *D. magna*, *S. capricornutum* e *B. subtilis* (Schering-Plough, 2009). A classificação ecotoxicológica como praticamente não tóxico e não causar risco para bioindicadores são características essenciais para um fármaco a ser utilizado na aquicultura.

Para as algas *T. chunii* (CI50;96h = 6,06 mg.L<sup>-1</sup>) (Ferreira et al.,2007), *Nostoc* sp. (CI50;48h = 4,0 mg.L<sup>-1</sup>), *S. capricornutum* (CI50;48h = 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) e para a bactéria *Bacillus subtilis* (CI50;48h = 0,4 mg.L<sup>-1</sup>) (Schering-Plough, 2009) o FFC foi mais tóxico do que para os organismos do presente trabalho.

A ENRO é altamente tóxica para a bactéria *Pseudomonas putida*, (CE50;96h 37 µg.L<sup>-1</sup>) (Farma Base, 2011), para as algas *Mycrocystis aeruginosa* (CE50 49 µg.L<sup>-1</sup>) e *Pseudokirchneriella subcapitata* (CE50 3100 µg.L<sup>-1</sup>) e há relatos de efeitos adversos em peixes somente quando a concentração excedeu 10 vezes a concentração recomendada no tratamento (Robinson et al., 2005).

Dessa forma é provável que os antibióticos sejam tóxicos para algas e cianobactérias, sendo este o principal motivo que levou a UE (EMEA/CVMP) a tornar o ensaio relativo às cianobactérias obrigatório para todos os antibióticos. Porém parece pouco provável que a ENRO coloque em risco invertebrados aquáticos (*D. magna*) e peixes (*Pimephales promelas*) apresentando risco  $< 0,01$  (EMEA, 1998). Esta alta toxicidade dos antibióticos para algas e cianobactérias é explicada porque estes compostos foram criados para afetar organismos unicelulares procariotos. Tal fato se justifica por serem mais relacionados com microalgas unicelulares do que organismos pluricelulares como microcrustáceos e peixes (Ferreira et al., 2007).

O TOL foi mais tóxico para o mato grosso seguido pelo caramujo, o microcrustáceo e praticamente não tóxico para a macrófita. A CE50;48h para *D. magna* é descrita como  $> 2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  (Bayer, 2006), como esse valor não foi exato pode ser que a toxicidade seja similar ao encontrado no presente trabalho  $18,57 \text{ mg.L}^{-1}$ .

O TH é menos tóxico para *D. magna* do que o guadipyr (CE50;48h de  $13,01 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Qi et al., 2013) e o imidacloprid (CE50;48h de  $10,44 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Song et al., 1997). O TH foi mais tóxico para pacu e mato grosso do que para *Lepomis macrochirus* (CL50;96h  $> 114,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e *Oncorhynchus mykiss* (CL50;96h  $> 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Barbee e Stout, 2009). Os neonicotinóides apresentam mecanismos de ação e estruturas similares, mas a diferença de toxicidade entre si se deve ao fator químico, estrutural, diferença de afinidade de ligação, modo de ação nos receptores de acetilcolina e aos diferentes metabólitos (Wakita et al, 2003; Nauen et al., 2003; Ford e Casida et al., 2006).

O risco do TH foi calculado com a CAE utilizada no controle de monogenéticos utilizando o produto comercial Agita<sup>®</sup>, que é utilizado no controle de moscas em estábulos, porém após a adequação da formulação para uso aquícola, ocorrerá um ajuste desta avaliação.

Apesar do TOL demonstrar ser o fármaco mais tóxico para o pacu, ele não coloca em risco esta espécie, pois apresenta janela terapêutica segura, ou seja, o intervalo entre a concentração letal e a concentração de tratamento é distante. Porém o TH e a ENRO não apresentam janela terapêutica necessitando cautela com seu uso.

Segundo Mallat (1985) a toxicidade de um xenobiótico varia com a espécie, a idade dos indivíduos, o peso e o nível trófico. Assim, as diferenças encontradas neste estudo e na literatura podem estar relacionadas com estas variáveis, visto que foram utilizados organismos de diferentes níveis tróficos.

Em relação ao estudo das interações das substâncias, FFC+TH apresentou efeito antagônico ( $S > 1$ ) para os organismos exceto para o *D. magna* que foi sinérgico. TOL+ENRO foi antagônico ( $S < 1$ ), exceto para mato grosso, que foi sinérgico. A interação de sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio caracteriza uma associação antagônica (Zagatto, 1995), assim como FFC+TH para a maioria dos bioindicadores.

A associação dos fungicidas epoxiconazole e piraclostrobin para tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Prestes et al., 2013) e a associação do organofosforado diclorvos e piretróide deltametrina para *Danio rerio* e *Hemichromis fasciatus* (Trevis et al., 2010) foram caracterizadas por efeito sinérgico, assim como a associação TOL+ENRO para a maioria dos organismos teste.

A avaliação da toxicidade de um xenobiótico para organismos não alvo possibilita estabelecer a segurança ambiental. Assim na classificação do fármaco é utilizado o organismo mais sensível, chamado *end point*, em que se para 90% dos organismos avaliados o fármaco é praticamente não tóxico, mas para um outro é altamente tóxico, sua classificação passa a ser altamente tóxico (CEC, 2003). Dessa forma o FFC passa a ser classificado como pouco tóxico, devido à sua  $CL_{50}$  97,03  $mg.L^{-1}$  para *L. minor*, a ENRO, pouco tóxica, pois para *P. canaliculata*,  $CE_{50}$  é 14,64  $mg.L^{-1}$ , o TOL, moderadamente tóxico, pois para *H. eques*,  $CL_{50}$  é 6,22  $mg.L^{-1}$  e o TH, pouco tóxico, pois para *H. eques*,  $CL_{50}$  é 49,78  $mg.L^{-1}$ .

Segundo Prestes et al (2013) os estudos ecotoxicológicos ilustram a necessidade de uma visão abrangente da toxicidade dos agentes químicos sobre espécies não-alvo, pois levando-se em conta a complexa biota aquática presente no ambiente natural e os diversos graus de sensibilidade entre as espécies, grupos pouco impactados pelo agente podem ser diretamente dependentes de outros que possuem elevada sensibilidade ao mesmo.

Caso os fármacos sejam utilizados na concentração, tempo de exposição, dias de tratamento e na forma correta (ração ou banho), o efeito destas associações, não deve oferecer risco aos bioindicadores e ao ambiente. Em tratamento, o parasiticida é usado pela manhã, na forma de banho terapêutico, e o antibiótico, na ração, ofertada no período da tarde. Portanto a possibilidade dos fármacos se encontrarem no ambiente é quase nula. Ainda é importante que o efluente dos tanques que foram tratados com os fármacos seja tratado antes do seu descarte para o ambiente, visto que causam risco e toxicidade para os bioindicadores.

O uso concomitante de um parasiticida e de um antibiótico para conter um surto nos peixes de criação é urgente, visto que, os animais são acometidos por mais de um tipo de patógeno. A avaliação do uso integrado dos fármacos na aquicultura está em fase inicial, porém se mostra cada vez mais necessário à medida que se torna imprescindível o uso de mais de um fármaco para evitar a dizimação de plantéis acometidos com surtos de doenças. Assim, essa avaliação deverá se intensificar à medida que a prática se tornar mais frequente.

Assim, a *L. minor* é o melhor bioindicador da toxicidade do florfenicol; o caramujo, da enrofloxacin e o mato grosso, do toltrazuril e do thiamethoxan, classificando assim o florfenicol, a enrofloxacin e o thiamethoxan como pouco tóxico e o toltrazuril, moderadamente tóxico. No tratamento de doenças é importante cautela com a utilização da enrofloxacin e do thiamethoxan, pois causam alto risco ambiental para o *P. mesopotamicus*.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. 2009. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713. Ecotoxicologia Aquática - **Toxicidade Aguda – Método de ensaio com *Daphnia* ssp** (Crustacea, Cladocera). Terceira Edição, 22 p.

ABNT. 2011. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – **Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. São Paulo, 19 p.

Barbee, G.C.; Stout, M.J. 2009. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. **Pest Manag Sci**, 65, 1250-1256.

Bastos, C.V.L.F.; Salles, J.B.; Valente, R.H.; Leon, I.R.; Perales, J.; Dantas, R.F.; Albano, R.M.; Bastos, F.F.; Bastos, J.C. 2007. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. **Biochimie**, 89, 1332-1342.

Bayer Healthcare. 2006. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ). **Baycox oral**, 5p.



CEC (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES). 2003. Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities, p. 337.

EMEA 1998. Enrofloxacin. European Medicines Agency. Anexo I. Lista das denominações, forma farmacêutica, dosagem do medicamento veterinário, espécies animais, via de administração e requerente nos estados-membros. 10p.

Farma Base Saúde Animal. 2011. **FISPQ – Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos. Eurofarm 5%**. 5p.

Ferreira, C.S.G.; Nunes, B.A.; Henriques-Almeida, J.M.M.; Guilhermino, L. 2007. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 67, p. 452–458.

Ford, K.A., Casida, J.E. 2006. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. **Chem Res Toxicol**, 19, 1549–1556.

Gaikowski, M.P.; Wolf, J.C.; Endris, R.G.; Gingerich, W.H. 2003. Safety of Aquaflor (Florfenicol, 50% Type A Medicated Article), Administered in Feed to Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. **Toxicol. Path.**, 3, 689–697.

Goktepe, I.; Portier, R.; Ahmedna, M. 2004. Ecological risk assessment of Neembased pesticides. **Journal of Environmental Science Health Part B. Pestic. Food Contam. Agric. Wastes B.**, 39(2), 311-320.

Hamilton, M.A. Russo, R.C. Thurston, V. 1977. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, 7, 714-719.

Hsu, H. M.; Bowser, P. R.; Schachte, J.H.; Scarlett, J. M. Jr.; Babish, J. G. 2007. Winter Field Trials of Enrofloxacin for the Control of *Aeromonas salmonicida* Infection in Salmonids, *Journal of the World Aquaculture Society*, 26(3), 307 – 314.

Inglis, V.; Richards, R.H.; Varma, K.J.; Sutherland, I.H.; Brokken, E.S. 1991. Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmo salar L*, parr: tolerance and assessment of efficacy against furunculosis. **J Fish Dis.**, v. 14, 343–351.

Intorre, L.; Cecchini, S.; Bertini, S.; Cognetti Varriale, A.M.; Soldani, G.; Mengozzi, G. 2000. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass *Dicentrarchus labrax*. **Aquac.**, 182, 49–59.

Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Can. J. Fish. Aqu. Sc.**, v.42, 630-648.

Marking, L.L. 1977. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. In: **Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation**. F.L. Mayer & Hamelink, J. (Eds) ASTM STP 634, 99-108.

Mehlhorn, H., Schmahl, G., Haberkorn, A. 1988. Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. Short communication. **Parasitol. Res.** 75, 64-66.

Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., Kaussmann, M, 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. **Pestic. Biochem. Physiol.**, 76, 55–69.

Novartis. **FISPQ- Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Agita 10 WG.** 5p., 2001. Disponível em: [http://www.novartis.com.br/\\_produtos/bulas/arq\\_1152\\_1876.pdf](http://www.novartis.com.br/_produtos/bulas/arq_1152_1876.pdf). Acesso em 14 de julho de 2011.

OECD. 2002. Organization for Economic Cooperation and Development. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. In: GUIDELINE for testing of chemicals.

Prestes, E.B.; Clemente, Castro, V.L.S, Z.Jonsson, C.M. 2013. Avaliação da Toxicidade Aguda de Piraclostrobin, Epoxiconazole sua Mistura em *Colossoma macropomum* (tambaqui). **Ecotox. Environ. Contam.**, 8(1), 125-128.

Qi, S.; Wang, C.; Chen, X.; Qin, Z.; Li, X.; Wang, C. 2013. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitinase activities. **Environ. Ecotox. Safety**. In Press.

Robinson, A.A.; Belden, J.B.; Lydy, M.J. 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. **Environ. Toxic. Chem.**, 24(2), 423–430.

Schering-Plough Animal Health. 2009. Aquaflor. Florfenicol. **Technical Monograph for catfish health professionals**, 36 p.

Schmahl, G.; Mehlhorn, H. 1988. Treatment of fish parasites 2. Effects of sym. Triazinona (toltrazuril) on monogenea. **Parasitol. Res.**, 75, 132-145.

Schmahl, G.; Mehlhorn, H.; Tarachewski, H. 1989. Treatment of fish parasites: Effects of sym. triazinone (toltrazuril) on skin parasitic Ciliophora (*Ichthyophthirius multifiliis* FOUQUET 1876, *Glossatella amoebae* GRENFELL 1884, and *Trichodina* spp. (EHRENBERG, 1831), **Eur. J. Protistol.**, 24, 152–161.

Seljestokken, B.; Bergh, O.; Mellingen, G.O.; Rudra, H.; Hetlilidolsen, R.; Samuelsen, O.B. 2006. Treating experimentally induced vibriosis (*Listonella anguillarum*) in cod, *Gadus morhua* L., with florfenicol. **J Fish Dis.**, 29, 737–742.

Song, M.Y.; Stark, J.D.; Brown, J.J. 1997. Comparative toxicity off our insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. **Environ. Toxic.Chem.**, 16, 2494–2500.

Syngenta. 2006. CRUISER 700WF. FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos, 7p.

Trevis, D.; Habr, S.F.; Varoli, F.M.; Bernardi, M.M. 2010. Toxicidade aguda do praguicida organofosforado diclorvos e da associação com o piretróide deltametrina em *Danio rerio* e *Hyphessobrycon bifasciatus*. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 36(1), 53 – 59.

USOFR (U.S. Office of the Federal Register). 2007. **Code of Federal Regulations**, Title 21, Parts 556.283, 558.4, 558.261. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Venturini, F.P. Cruz, C. Pitelli, R.A. 2008. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*). **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 30.

Venturini, F.P. 2010. **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) exposto a concentração**

**sub-letal de triclorfon e recuperação.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução. 90p.

Wakita T, Kinoshita K, Yamada E, Yasui N, Kawahara N, Noal A, *et al*, 2003. The discovery of dinotefuran: a novel neonicotinoid. **Pest. Manag. Sci.**, 59, 1016–1022.

Zagatto, P. A. 1995. **Evaluation écotoxicologique du réservoir Guarapiranga, Brésil em relation avec le problème des algues toxiques e algicides.** Tese de Doutorado. Universidade de Metz. França. 86p.

Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. 2008. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações**, Editora Rima, São Carlos, 478 p.

Zucker, E. 1985. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. **USEPA** Publication, Washington, 540 (9), 85-006.

## ARTIGO 2 - EFICÁCIA DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS EM *Piaractus mesopotamicus*

### RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar a eficácia do toltrazuril (TOL) no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina heterodentata*, *Anacanthorus penilabiatus*; do thiamethoxan (TH) no controle de *A. penilabiatus* e da enrofloxacin (ENRO) e do florfenicol (FFC) no controle de *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp em pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Para tanto, o TOL e o TH foram administrados em banhos terapêuticos, por quatro dias, e a ENRO e o FFC, inseridos na ração e ofertados aos peixes doentes, por sete dias. A concentração de TOL e de ENRO foi ajustada em condições de microcosmo e a concentração de TH foi ajustada em laboratório e microcosmo. Posteriormente, o TOL com a ENRO e o TH com o FFC foram estudados em condição de mesocosmo. O TOL foi 100% eficaz no controle de *I. multifiliis*, em microcosmo, e de *T. heterodentata*, em mesocosmo e a ENRO 100% eficaz no controle de *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp, em mesocosmo. A eficácia do TH foi de 81,86% no controle de *A. penilabiatus*, em mesocosmo e o FFC diminuiu a carga de bactérias dos peixes. Nas amostras coletadas para análise microbiológica foram encontradas sepas de *Aeromonas* sp. e *Streptococcus* sp. O TH apresentou melhor desempenho no controle dos patógenos estudados em condição de mesocosmo, e apresenta potencial para ser utilizado na aquicultura.

**Palavras chave:** drogas; peixes de criação; aquicultura

## ARTICLE 2: EFFECTIVENESS OF THERAPEUTIC AGENTS IN DISEASE TREATMENT IN *Piaractus mesopotamicus*

<sup>1</sup>Silvia Patrícia Carraschi: Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, SP. Departamento de Fitossanidade. Via de Ac. Prof. Dr. Paulo Donato Castellani, s/ no, Zona Rural, CEP: 14884-900. Campus de Jaboticabal, SP, Brazil. Phone: (+5516)3209-2630. e-mail: pacarraschi@yahoo.com.br – Corresponding author

<sup>2</sup>Roberto Barbuio: NEPEAM. E-mail: betovet04@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Cynthia Venâncio Ikefuti: NEPEAM e CAUNESP. Mail: cynthia.ikefuti@gmail.com

<sup>4</sup>Taise Florêncio: NEPEAM. e-mail: taise\_florencio@hotmail.com

<sup>5</sup>Dr. Claudinei da Cruz. Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (Unifeb), Barretos (SP), Brazil. E-mail: cruzcl@yahoo.com

<sup>6</sup>Dra. Maria José Tavares Ranzani-Paiva: Instituto de Pesca de São Paulo, SP. E-mail: mase@pesca.sp.gov.br

**Aceito na Aquaculture: *IN PRESS*** - Carraschi, S.P., et al., Aquac. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.026>

### ABSTRACT

The use of drugs in aquaculture is necessary to combat pathogens responsible for causing high rate of mortality in fish farming, such as infection by ectoparasites. The aim of this research was to evaluate the efficacy: (A) of toltrazuril (TOL) treatment against *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina heterodentata* and *Anacanthorus penilabiatu*s; (B) of thiamethoxan (TH), in treating fish infected by *A. penilabiatu*s and (C) of enrofloxacin (ENR) and florfenicol (FFC) against *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. The drugs TOL and TH were administered in therapeutic baths while ENR and FFC were mixed to the fish food. The drug concentrations were adjusted accordingly to the experimental conditions (laboratory, microcosm or mesocosm). The drug TOL presented a treatment efficacy rate of 100% against *I. multifiliis* in microcosm and *T. heterodentata* in mesocosm. Moreover, ENR presented an efficacy rate of 100% in treating fish infected by *Aeromonas* sp and *Streptococcus* sp in mesocosm. Finally, TH efficacy rate in controlling *A. penilabiatu*s infection was 81.86% in mesocosm and

FFC decreased the overall bacterial load in infected fish. *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. strains were found in the samples collected for microbiological analysis. In conclusion, TH presented a high efficacy in treating fish against *A. penlabiatus* infection while TOL was better in controlling *T. heterodontata*. The antibiotics used in mecoscosm condition presented potential to be used against bacterial infection in aquaculture.

**KEY WORDS:** drugs; farmed livestock; aquaculture; microcosm; mesocosm; treatment

## 1. INTRODUCTION

The intensification of fish farming in tropical regions has been linked to the increase of parasitic and bacterial infections. Recent studies indicate that bacterial contamination, and more specifically, infections by *Aeromonas* and *Streptococcus*, have a negative financial impact in fish farming (Nunes, 2007; Xu *et al.*, 2007). On a global scale, the occurrence of parasites is also associated with significant monetary losses for fish farmers.

This is especially true for infestations caused by the protozoan *Ichthyophthirius multifiliis*, during early fish developmental stages. In Brazil, this parasite is associated with high mortality rate during the cold season, and often occurs in association with *Aeromonas hydrophila* (Ghiraldelli *et al.*, 2007; Liu and Lu, 2004). Another common parasite in aquaculture is the *Trichodina heterodentata*; fish infected by this parasite present abnormal epithelial proliferation in the skin and gills, and severe lamellae aberrations (Yemmen *et al.*, 2011; Pádua *et al.*, 2012). *Trichodina heterodentata* infection is also normally associated with infections by other bacteria and parasites, according to Xu *et al.* (2007).

In order to prevent bacterial and parasite infections, fish farmers often make use of drugs known to avoid the spreading of such pathogens. They often have to decide which is the most appropriate treatment regimen to be adopted, while considering factors such as environmental risks, treatment efficacy and possible impacts in consumer health. Unfortunately, fish farmers do face a shortage of government-approved drugs to combat these pathogens, and therefore studies investigating the efficacy of new drugs against the target pathogens, as well as evaluating the potential environmental and health risks associated with these new drugs become imperative to the continuous development of aquaculture.

Some drugs such as the antibiotic enrofloxacin (ENR) already have an established use in veterinary medicine but are not yet licensed for use in aquaculture. Florfenicol (FFC), on the other hand, already has Brazilian governmental approval for treatment of some species such as tilapia and trout (Schering-Plough, 2009). In some cases, drugs that have been proven to work against a large plethora of pathogens, such as toltrazuril (TOL) (Bermúdez *et al.* 2006), are still missing the approval for use in aquaculture in Brazil. Finally, new findings demonstrate that drugs such as thiamethoxan (TH), which have not yet been used in fish farming, could potentially be employed against ectoparasite infections that normally affect *Piaractus mesopotamicus*



(pacu). Thus, it is very important for tropical countries to develop reliable studies proving the efficacy of such drugs in different conditions, such as elevated temperature, luminosity and humidity.

In order to analyze the efficiency of those drugs it is primordial to use adequate animal models. For the purpose of this study the Neotropical fish *P. mesopotamicus* (from now on referred to as pacu) was used. Pacu is widely used in aquaculture due to its fast rate of growth, low maintenance requirements and easy adaptability to different ecosystems (Oliveira *et al.*, 2004).

The aims of this study were to evaluate the efficacy of the following drugs against different pathogens: thiamethoxan (TH), in controlling the proliferation of *A. penilabiatus* in laboratory and microcosm conditions; TH associated with florfenicol (FFC) in controlling *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. infections in mesocosm conditions; toltrazuril (TOL) against *I. multifiliis*, *A. penilabiatus* and *T. heterodontata* infections, and combined with enrofloxacin (ENR) in combating the infestation of *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. in microcosm and mesocosm conditions, using pacu as our animal model.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 EVALUATING THE EFFICACY OF TOLTRAZURIL AND ENROFLOXACIN

Juvenile pacu were kept in 400-liter tanks, in the following conditions: low dissolved oxygen ( $< 1.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), average temperature  $22 \pm 0.8 \text{ }^\circ\text{C}$  and overload of organic matter. The fish received a commercial diet (crude protein: 35%, Fri-Aqua) in excess every second day, and captured animals were kept out of water for 2 minutes; this procedure was undertaken during a period of 15 days as described previously in the literature (Carraschi *et al.*, 2011).

Pacus naturally infested with the pathogen *I. multifiliis* (over 500 trophonts) were captured in local farms and added to the tanks, thus allowing the spreading of ichthyophthiriasis to the whole fish population by the process of cohabitation (Davis *et al.*, 2002).

The assessment of parasites on the epidermal surface and gills was performed after the fish population exhibited visible signs of infection – some mortality and trophonts (Yi *et al.*, 2012). For microcosm studies, fish with parasite count with over 200 ictio.fish<sup>-1</sup> were selected. For the mesocosm studies, a mixed selection parameter was

used where the criteria was the presence of at least 100 ictio.fish<sup>-1</sup>; at least 40 *T. heterodontata*.fish<sup>-1</sup> and at least 50 monogeneans.fish<sup>-1</sup>.

In both tests there were fish with parasites and bacteria, as well as healthy fish, depending on the treatment to be applied. In the microcosm tests the juvenile pacus used had an average weight of 9.25 ± 2.71 grams, while those used in the mesocosm tests had an average weight of 31.40 ± 2.77 grams. All animals used in this study were from the Aquaculture Center at Unesp (Jaboticabal, Sao Paulo, Brazil).

In addition to the parasite count, the occurrence of bacteria on the epidermal surface was also evaluated throughout this study. For this purpose, five different microscopic fields under 1000x magnification were analyzed per slide, per fish. The activity of cocci and rods was evaluated and a scale was attributed, ranging from five crosses (+++++) to one cross (+), according to density observed under the microscope (Modelo LX400, Labmed) (Table 1). This scale was used to determine the correct moment to begin the experimental treatments. All fish that were subjected to the treatment regimen exhibited a density of bacterial presence equivalent to four crosses. Usually the fish at this stage of infection presented severe clinical signs. After parasites and bacteria were counted, five infected fish were distributed in 60 liters boxes to receive the pre-determined treatment.

**Table 1. Range of bacterial count estimates in scraped epithelial samples from pacu**

Estimate	Classification	Clinical Signs (population)
+++++	High Density	Death
++++	Medium Density	Widespread clinical signs
+++	Low Density	Common clinical signs
++	Relevant Density	Onset of clinical signs
+	Natural Microbiota	No clinical signs

Treatment for fish in microcosm conditions consisted of (A) 1.0 mg TOL.L<sup>-1</sup> and 60.0 mg ENR.day<sup>-1</sup>, (B) 2.0 mg TOL.L<sup>-1</sup> and 75.0 mg ENR.day<sup>-1</sup> and (C) 3.0 mg TOL.L<sup>-1</sup> and 90 mg ENR.day<sup>-1</sup>. The most effective treatment regimen in microcosm (C) was used to further evaluate its efficacy in mesocosm conditions.

Enrofloxacin was dissolved in 2% vegetable oil and added to the commercial fish food (which contained 40% protein). After the drug was mixed with the food, it was left to dry at 25 °C. The treatment consisted in feeding the fish once a day with 1.5% body

weight during seven consecutive days. Toltrazuril was applied directly in the water; the fish were exposed to the drug for an hour, for five days. The drugs used were purchased at local agricultural supermarket, labelled as the commercial products Baytril® (enrofloxacin) and Baycox® (toltrazuril).

For the purposes of this study, the fish were grouped as follows: fish that received treatment (FT); infested, non-treated control (InC); healthy control submitted to treatment (ExC); and control group with no infestation or treatment (CS). All tests were randomized and performed in triplicates. Except during TOL treatment (one hour), which was performed in closed flow, the water in the tank was kept at a constant flow rate of 6 ml.s<sup>-1</sup>. The microcosm tests consisted of five fish per trial, to a total of 15 fish per treatment, whereas the mesocosm tests consisted of twenty fish per trial to a total of 60 fish per treatment.

## 2.2 EVALUATING THE EFFICACY OF THIAMETHOXAN AND FLORFENICOL

Juvenile pacu (average weight: 40.37 ± 10.78 g – laboratory; 38.99 ± 20.07 g – microcosm and 67.64 ± 15.73 g – mesocosm), were maintained as described in the previous section. Similarly, fish naturally infested with *A. penilabiatum* were collected from local fish farms and added to the study group. Fish were then kept in a high-density culture in order to facilitate a high rate of parasitic infestation (Cruz *et al.*, 2008).

After fifteen days, three fish were sampled, and the parasite count on the surface of the epidermis and gills was evaluated. The initial parasite count for the fish in the laboratory group was 235.29 ± 162.7 parasite.fish<sup>-1</sup>, in microcosm, 613.63 ± 462.83 parasite.fish<sup>-1</sup> and in mesocosm, 238.7 ± 134.21 parasite.fish<sup>-1</sup>. Moreover, it was observed in the mesocosm sample a significant bacterial content (++++), which were later identified as *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp., as described in section 2.3.

Five experiments were performed in the laboratory group in order to define the ideal experimental treatment for the larger microcosm and mesocosm groups. These experiments involved different drug concentrations, exposure time and total number of days that the drug was administered. Tested concentrations ranged from 25 to 150 mg.L<sup>-1</sup>, exposure times varied between one, two or three hours, during three or four days of administration. The drug used here was purchased at local agricultural supermarket as the commercial product Agita® (thiamethoxan).

After TH effectiveness in controlling the *A. penilabiatu*s infestation in pacu was confirmed in laboratory conditions, four concentrations were selected to further investigate the treatment of fish growing in microcosm, as follows: 50.0 mg.L<sup>-1</sup> – 2 h closed water flow, three days – adjusted for four days; 75.0 mg.L<sup>-1</sup> – 2h closed water flow, three days – adjusted for four days; 100.0 mg.L<sup>-1</sup> – 2h closed water flow, three days; 125.0 mg.L<sup>-1</sup> – 2h closed water flow, three days.

Following the tests in microcosm conditions, the concentration of 75.0 mgTH.L<sup>-1</sup> in conjunction with 10.0 mgFFC.Kg<sup>-1</sup> (four days – 2h closed water flow) was selected to test the efficacy of the TH + FFC combination in controlling both parasite (*A. penilabiatu*s) and bacterial (*Aeromonas sp* and *Streptococcus sp.*) infestations in mesocosm conditions. The stipulated florfenicol concentration was approved for use against *Aeromonas sp.* and *Streptococcus sp.* in tilapia and previously used in pacu as described by Carraschi *et al.* (2011). Florfenicol was kindly donated by MSD<sup>®</sup>, as the commercially available product Aquaflor<sup>®</sup>.

The laboratory assays were performed in aquariums containing 8 liters of water and three fish per trial. For microcosm assays, boxes of 60 liters were used with five fish each per trial. In the mesocosm conditions, 20 fish were grown in tanks of 400 liters. All treatments were performed in triplicates.

In the end of the treatment, 5 fish from laboratorial, 10 fish from microcosm and 10 fish from mesocosm conditions were sampled. The samples were tested in order to evaluate the parasites and bacterial counts.

The water parameters were constant throughout the duration of the experiments. The temperature was kept between 25 and 30 °C, the dissolved oxygen was > 5.0 mg.L<sup>-1</sup>, electrical conductivity stayed between 180 and 220 µS.cm<sup>-1</sup> and the pH ranged from 7.0 to 8.0.

The averages of parasite quantification in the end of treatment were submitted to statistical analysis ANOVA and Tukey Test, (p < 0,05) using the software STATISTICA.

## 2.3 MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

The fish were not experimentally subjected to bacterial infection in our experiments because they were already very debilitated by the high load of parasites which presence allowed for contamination by opportunistic bacteria (Lazar *et al.*, 2012).

This was confirmed by the observation of a high bacterial count, visualized under 1000x magnification.

A high density of bacteria was observed on the epidermal surface (++++) as well as clinical signs such as eroded fins and some dorsal petechiae. Thus, we investigated samples of liver, kidney, skin and brain (n=5), for presence of *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp.

For the identification of *Aeromonas* sp., samples from skin, liver and kidney were cultivated in phenol red starch ampicillin media and transferred to nutrient agar media. Subsequently, the samples were Gram stained and subjected to a catalase reaction. The colonies were observed to be gram- and catalase positive, thus providing a positive identification as genres *Aeromonas* sp.

For the identification of *Streptococcus* sp., samples from liver, kidney and brain were cultivated in blood agar plates and suggestive colonies were later transferred to dextrin agar. The suggestive colonies had clear color and transparent halos indicating hemolysis. Before the samples were submitted to Gram staining and subjected to a catalase reaction. The colonies were thus identified as gram+ and catalase negative, indicating genres *Streptococcus* sp.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 TOLTRAZURIL AND ENROFLOXACIN EFFICACY

In microcosm conditions, toltrazuril was 100% effective in controlling *I. multifiliis* infections ( $p > 0.05$ ), in all concentrations tested. In regards to infection by monogeneans (*A. penilabiatum*), there was a significant reduction in number of parasites found in the gills, with an average of  $18 \pm 2.16$  parasites.fish<sup>-1</sup> in the fish treated with 1.0 mg.L<sup>-1</sup>;  $16.4 \pm 7.99$  parasites.fish<sup>-1</sup>, with 2.0 mg.L<sup>-1</sup> and  $27.10 \pm 16.47$  parasites.fish<sup>-1</sup>, with 3.0 mg.L<sup>-1</sup>. All fish from the infested control group died, hence the drug efficacy was calculated as a function of the initial parasitic count. We considered enrofloxacin effectiveness at 100% at 90 mg.day<sup>-1</sup> because the amount of bacteria present after that treatment was estimated to be equivalent to natural microbiota (Table 2), whereas the efficacy of other concentrations was considered to be below 50%.

**Table 2. Effectiveness of toltrazuril and enrofloxacin in control of parasites and bacteria in pacu, *P. mesopotamicus*, in microcosm conditions.**

TOL (mg.L <sup>-1</sup> )	<i>I. multifiliis</i> (%)	<i>A. penilabiatus</i> (%)	ENRO (mg.dia <sup>-1</sup> )	Bacteria (+)	Survival (%)
1,0	100	70,00	60,0	33,33	30
2,0	100	72,67	75,0	47,14	70
3,0	100	53,84	90,0	100	50
Control	0	0	Control	0	0

In mesocosm conditions, the dosage of 3.0 mg TOL.L<sup>-1</sup> and 90.0 mg ENRO.day<sup>-1</sup> was 100% effective ( $p > 0.05$ ) in controlling *T. heterodontata* infections. No parasites of this specie was found in the treated fish, in contrast with InC fish that showed  $93.7 \pm 89.4$  parasites.fish<sup>-1</sup>. It was not possible to evaluate the efficacy of TOL against *I. multifiliis* in mesocosm conditions since there was no infestation found after seven days in neither the treated, nor in the non-treated fish. In regards to infection by monogeneans (*A. penilabiatus*), TOL presented an efficacy of 39.80%, with  $34.8 \pm 34.1$  parasites.fish<sup>-1</sup> in the treated fish and  $87.4 \pm 79.6$  parasites.fish<sup>-1</sup>, in infected, non-treated fish at the end of the experiment. It has been shown that TOL acts by causing irreversible damage in the tegument of monogeneans *Dactylogyrus* and *Pseudodactylogyrus bini*, with vacuolization and disruption of the peduncle and prohaptor tegument (Schmahl *et al.*, 1988).

Toltrazuril effectiveness in monogeneans control was verified in other species as well (Schmahl and Melhorn, 1988). However, the concentration found to be effective against *I. multifiliis* in pacu in microcosm (1.0 mg.L<sup>-1</sup>) is ten fold smaller than that found to be sufficient against *I. multifiliis*, microsporidea and myxozoa (10.0 mg.L<sup>-1</sup>) in carp, trout and eel, and half of the necessary bronopol concentration that is effective against *I. multifiliis* in *Oncorhynchus mykiss* (Mehlhorn *et al.*, 1988; Picón-Camacho *et al.*, 2012). This is a favourable feature as it reduces the amount of chemicals introduced in the environment when treating these pathogens, therefore reducing the potentially toxic effects of the exposure of non-target organisms to these chemical agents.

The effective concentration against *T. heterodontata* in pacu (3.0 mg.L<sup>-1</sup>) was 16.66 times smaller than the concentration used to treat *Trichodina* sp. (50.0 mg.L<sup>-1</sup>) in *O. mykiss* and *Anguilla anguilla* (Mehlhorn *et al.*, 1988). This difference may be due to the temperature in which each fish lives, since the temperature affects the activity of xenobiotics (Costa and Olivi, 2008). The ideal temperature for pacu is 27 °C (Dias-

Koberstein *et al.*, 2005) and 19 °C for *O. mykiss* (Alexandrino *et al.*, 1998/1999). In this study the average temperature was 26.36 °C, making toltrazuril more effective than it was in another study that used trout as a model (Mehlhorn *et al.*, 1988).

According to Jaafar and Buchmann (2011), TOL can be added to the ration as well. The addition of 2.5 mgTOL.g<sup>-1</sup> for three days before the challenge with *I. multifiliis* did not change the palatability of the ration and was enough to inhibit the growth of theronts in *O. mykiss*. Nevertheless, it was not effective in the treatment of trophont infestation. The findings of our study indicate that in pacu, toltrazuril is capable of inhibiting the infestation by trophonts.

The low efficacy of toltrazuril in mesocosm may be explained at least in part by the establishment of favourable conditions for the fish physiology. The transfer of the fish from infestation tanks – with excess of organic matter, low temperature (22 °C), low oxygen (< 1.0 mg.L<sup>-1</sup>), and high fish density (0.3 fish.L<sup>-1</sup>) – to tanks with good water quality (oxygen > 4 mg.L<sup>-1</sup>), ideal comfort temperature (average temperature 26.36 °C), and low fish density (0.05 fish.L<sup>-1</sup>) may have provided the animals with ideal conditions to fight off the infections by monogeneans and *T. heterodontata*, independently of grouping under control or drug-treated conditions.

Toltrazuril is currently licensed to treat protozoan infections in a wide variety of animals such as sheep, canines, swine, cattle and poultry (Gjerde and Helle, 1991; Dauschies *et al.*, 2000; Driesen *et al.*, 2008; Ghanem *et al.*, 2008; Krautwald-Junghanns *et al.*, 2009), but not in fish (Jaafar and Buchmann, 2011), in a range of countries. The efficacy studies show that its use in control of parasites is practical and consequently it may in the future be used in aquaculture.

Enrofloxacin was effective in controlling bacterial infections (*Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp.) associated to infection by parasites (*I. multifiliis*, *A. penilabiatum* and *T. heterodontata*), where 80% of fish showed relevant bacterial density (++), but no clinical signs. It has also been shown that enrofloxacin is effective against *A. salmonicida* in trout (*Salvelinus fontinalis* and *S. namaycush*) when used at 10.0 mg.kg<sup>-1</sup> for 10 days, in controlling *Renibacterium salmoninarum* in salmonids (1.25 to 2.5 mg.kg<sup>-1</sup>, for ten days) in trout (*Oncorhynchus mykiss*) (1.25 to 2.5 mg.kg<sup>-1</sup>, for ten days) and in *Salmo salar* (10.0 mg.kg<sup>-1</sup>, ten days) (Bowser *et al.*, 1990; Hsu *et al.*, 1994; Bowser *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 2007).

Enrofloxacin is a second-generation quinolone that inhibits bacterial DNA gyrase activity. It has good pharmacokinetic properties and high bioavailability (Kim *et al.*,

2006). Enrofloxacin can also be administered via injection, as it was described by Lower and Poet, (2001) and is effective in control of mycobacteriosis in *Trichogaster trichopterus sumatranus* and *Pterophyllum scalare*, using 10.0 mg.kg<sup>-1</sup> for three days.

Stress can be a cause of lower immunity and make the fish more susceptible to pathogens. The control of the parasites that can act as an entryway disease, and the contributions of ENR in the mitigation of these bacteria can be considered essential to increase the fish survival rates in aquaculture.

### 3.2 THIAMETHOXAN AND FLORFENICOL EFFICACY

Laboratory assays showed that thiamethoxan was competent in the control of *A. penilabiatu*s infections and the length of exposure to the drug was the principal determinant of its efficacy (Table 3).

**Table 3. Effectiveness of thiamethoxan in control of *A. penilabiatu*s in pacu, *P. mesopotamicu*s, in laboratory conditions.**

Concentration mg.L <sup>-1</sup> (exposure hours) application days	Average parasite.fish <sup>-1</sup>	Effectiveness (%)
0,0	222,5 ± 3,54	0,0
25,0 (1h) 3 d	45,0 ± 7,07	79,77
50,0 (1h) 3 d	23,5 ± 3,54	89,43
0,0	340,0 ± 84,85	0,0
50,0 (2h) 3 d	86,5 ± 26,16	74,56
65,0 (1h) 3 d	99,0 ± 8,49	70,88
75,0 (1h) 3 d	105,0 ± 0,0	69,12
0,0	329,0 ± 32,53	0,0
75,0 (2h) 3 d	168,0 ± 106,08	48,93
100,0 (1h) 3 d	125,7 ± 27,51	61,79
0,0	402,0 ± 205,25	0,0
75,0 (3h) 3 d	138,0 ± 81,50	65,67
100,0 (3h) 3 d	118,7 ± 73,76	70,47
125,0 (2h) 3 d	75,5 ± 26,16	81,22
150,0 (1h) 3 d	142,0 ± 42,58	64,67
0,0	520,66 ± 370,08	0,0
100,0 (3h) 4 d	119,0 ± 44,17	77,14
125,0 (3h) 4 d	69,50 ± 42,67	86,65

In microcosm assays the efficacy of TH was higher than 80% (Table 4), however with the use of 100 and 125 mg.L<sup>-1</sup>, it was observed mortality after two administrations,



of 22.22 and 13.34% of the fish, respectively. The surviving fish showed darkening of skin. The fish exposed to 50 and 75.0 mg.L<sup>-1</sup> did not show clinical signs of intoxication, which suggests the fish could metabolize the drug at these concentrations without physiological damage. The mortality observed with the higher drug concentrations can also be due to the effects of a high parasite load.

**Table 4. Effectiveness of thiamethoxan in control of *A. penilabiatus* in pacu, *P. mesopotamicus*, in microcosm conditions.**

mgTH.L <sup>-1</sup> (exposure hours) Application days	Average parasite.fish <sup>-1</sup>	Effectiveness (%)
0,0	407,33 ± 94,20	0,0
50 (2) 4 d	73,6 ± 52,61	81,93
75 (2) 4 d	53,4 ± 25,68	86,89
0,0	479 ± 74,67	0,0
100 (2) 3 d	74,0 ± 17,35	84,55
0,0	571,0 ± 476,90	0,0
125 (2) 3 d	25,6 ± 17,18	95,52

In mesocosm conditions, thiamethoxan was 81.86% effective in control of *A. penilabiatus* infections. The treated fish showed 29.5 ± 28.6 parasite.fish<sup>-1</sup> whereas the control group showed 162.6 ± 182.31 parasite.fish<sup>-1</sup>. No mortality was observed during the seven days of the assay and the treated fish did not present signs of intoxication. This effectiveness of TH was considered good, being above of recommended in Mercosul (2012) (> 80%) for anthelmintic product commercialization.

The concentration of thiamethoxan used in this study was higher than that of praziquantel (5.0 mg.L<sup>-1</sup>) used to control pseudodactylogyrosis in *A. anguilla* and that of parathion-methyl (7.0 mg.L<sup>-1</sup>) used to control monogeneans in pacu in other studies (Buchmann *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2008). In this research we used the Agita<sup>®</sup> 10WG commercial formulation and confirmed its efficacy in controlling *A. penilabiatus* infections in pacu. Efforts to improve the performance of this drug would include the development of a specific formulation to aquaculture, adjusting dosages and determining the lowest active concentrations, therefore decreasing the amount of chemicals dispersed in the environment.

Sixty percent of the fish treated with florfenicol had bacterial densities equivalent to natural microbiota (+). In contrast, of the fish non-treated group, 40% showed high bacterial density (+++) and 60% of them, a relevant density (++) .

Florfenicol is registered in Brazil to be used against mobile *Aeromonas* and *Streptococcus* sp. in *Oreochromis niloticus* and against *Yersinia ruckeri* in *O. mykiss* (Schering Plough, 2009). The same concentration is effective in control of *Edwardsiella ictaluri* infections in *Ictalurus punctatus*, of furunculosis in *Salmo salar*, of vibriosis in *Gadus morhua* and of *A. hydrophila* in *P. mesopotamicus* (Carraschi *et al.*, 2011; Gaikowski *et al.*, 2003; Inglis *et al.*, 1991; Nordmo *et al.*, 2006; Seljestokken *et al.*, 2006).

In this study, the efficacy of the antibiotics was calculated subjectively by estimating the total quantity of bacteria present in the skin. It is known, however, that *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. may be present in other target organs such as kidney, liver and brain (Carraschi *et al.*, 2012; Azad *et al.*, 2012) that were not quantified in this work. Therefore, a continuation of these studies is necessary to evaluate specifically the efficacy of enrofloxacin and florfenicol in controlling infections by *Streptococcus* sp. and *Aeromonas* sp. in experimentally infected fish.

The drugs used in this study may be of interest for future use in aquaculture, given the observed satisfactory effectiveness of toltrazuril, thiamethoxan, enrofloxacin and florfenicol against *I. multifiliis*, *T. heterodontata*, *A. penilabiatus*, *Aeromonas* sp. and *Streptococcus* sp. in pacu.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To FAPESP, scholarship #09888-6/2010 and supporting grant #08453-9/2011.

## REFERENCES

- Alexandrino, A.C., Okumura, M.P.M., Baldassi, L., Tabata, Y.A., Pauli, A.O.S., Araujo, A.P., Rosa, M.B. 1998/1999. Ocorrência de infecção por *Edwardsiella tarda* em truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo. **Bol. Inst. Pesca**. 25, 121 – 123.
- Azad, I.S., Al-Marzouk, A., James, C.M., Almatar, S., Al-Gharabally, H., Qasem, J.A. 2012. Outbreak of natural Streptococcosis in hatchery produced silver pomfret (*Pampus argenteus* Euphrasen) larvae in Kuwait. **Aquacult**. 330–333, 15–20.
- Bermúdez, B., Alemañ, N., Vigliano, F., Vázquez S., Quiroga, M.I., Nieto, J.M. 2006. Effects of symmetric triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Enteromyxum*

- scophthalmi* parasitizing turbot (*Scophthalmus maximus* L.): A light and electron microscopic study. **Aquacult.** 254 (1-4), 65-71.
- Bowser, P.R., Schachte J.H.Jr., Wooster, G.A.; Babish, J.G. 1990. Experimental Treatment of *Aeromonas salmonicida* Infections with Enrofloxacin and Oxolinic Acid: Field Trails. **J. Aqu. An. Heal.** 2, 198-203.
- Bowser, P.R., Wooster, G.A., Hui Min, H.S.U. 1994. Laboratory Efficacy of Enrofloxacin for the control of *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout. **J. Aqu. An. Heal.** 6, 288-291.
- Buchmann, K., Kania, Per W., Neumann, L.S., DE'BESI, G. 2001. Pseudodactylogyrosis in *Anguilla anguilla* (Actinopterygii: Anguilliformes: Anguillidae): change of control strategies due to occurrence of anthelmintic resistance. **Acta Ichth. Et Pisc.** 41(2), 105–108.
- Carraschi, S.P., Cruz, C., Machado Neto, J.G., Castro, M.P., Bortoluzzi, N.L., Gírio, A.C.F. 2011. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 63 (3), 579-583.
- Carraschi, S.P; Cruz, C., Machado Neto, J.G., Ignácio, N. F.; Barbuio, R.; Machado. M.R.F. 2012. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. **Ecot. Envir. Saf.**, 83, 115–120.
- Castro, F.J., Fernandes, M.N. 2009. Efeito da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismo de defesa inata em peixes cultivados. In: Tavares-Dias M. (Ed.) **Manejo e Sanidade de peixes em cultivo**. Macapá. Embrapa Amapá, 361-288.
- Costa, C.R., Olivi, P. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova.** 31 (7), 1820-1830.
- Cruz, C. Machado Neto, J.G. Fujimoto, R.Y. Henares, M.N.P. Duó, D.A. 2008. Eficácia do paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenoidea) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Bol. Inst. Pesca.** 34, (1), 61 - 69.
- Dauguschies A., Mundt H.C., Letkova V. 2000. Toltrazuril treatment of cystoisosporosis in dogs under experimental and field conditions. **Parasit. Res.** 86 (10), 797–799.
- Davis, K.B., Griffin, B.R., Gray, W.L. 2002. Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. **Aquacult.**, 214, 55–66.

- Dias-Koberstein, T.C.R., Carneiro, D.J., Urbinati, E.C. 2005. Tempo de trânsito gastrointestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. **Acta Sci. Anim. Sci.**, 27(3), 413-417.
- Driesen S.J., Fahy V.A., Carland P.G. 2008. The use of toltrazuril for the prevention of coccidiosis in piglets before weaning. **Austral. Vet. J.** 72 (4). 139–141.
- Gaikowski, M.P., Wolf, J.C., Endris, R.G., Gingerich, W.H. 2003. Safety of Aquaflor (Florfenicol, 50% type a medicated article), administered in feed to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Toxicol. Path.** 3, 689–697.
- Ghanem, M.M., Radwaan, M.E., Moustafa, A.M.M., Ebeid, M.H. 2008. Comparative therapeutic effect of toltrazuril, sulphadimidine and amprolium on *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* given at different times following infection in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). **Prev. Vet. Med.** 84 (1–2), 161–170.
- Ghiraldelli, L., Adamante, W.B., Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Streit, A.A.R., Berestinas, A.C., Loureiro, C., Francisco, C.J. 2007. Infecção com trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* (ciliophora) em *Poecilia vivipara* (Poeciliidae) como hospedeiro experimental. **Ciê. An. Bras.** 8 (1), 105-110.
- Gjerde, B., Helle, O. 1991. Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. **Vet. Paras.** 38 (2–3), 97–107.
- Hsu, H.M., Wooster, G.A., Bowser, P.R. 1994. Efficacy of Enrofloxacin for the Treatment of Salmonids with Bacterial Kidney Disease, caused by *Renibacterium salmoninarum*. **J. Aqu. Anim. Heal.** 6, 220-223.
- Hsu, H-M; Bowser, P. R.; Schacte, J.H.; Scarlett, J. M. JR., Babish, J. G. 2007. Winter Field Trials of Enrofloxacin for the control of *Aeromonas salmonicida* infection in salmonids. **J. World Aquac. Soc.**, 26 (3), 307-314.
- Inglis, V., Richards, R. H., Varma, K. J., Sutherland, I. H., Brokken, E. S. 1991. Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, parr: tolerance and assessment of efficacy against furunculosis. **J. Fish Dis.** 14, 343–351.
- Jaafar, R.M., Buchmann, K. 2011. Toltrazuril (Baycox<sup>®</sup>Vet.) in feed can reduce *Ichthyophthirius multifiliis* invasion of rainbow trout (Salmonidae). **Acta Ichth. Et Pisc.** 41 (1), 63–66.
- Kim, S., Chung, H.S., Ha, J.Y., Jung, W.C., Heo, S.H., Lee, H.J. 2006. Application of solid-phase fluorescence immunoassay to determine oxytetracycline and tetracycline residues in tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **J. Vet. Med. Sci.** 68 (11), 1243-1245.

- Krautwald-Junghanns, M.E., Zebisch, R., Schmidt V. 2009. Relevance and treatment of coccidiosis in domestic pigeons (*Columbia livia* forma domestica) with particular emphasis on Toltrazuril. **J. Avian Med. Surg.** 23, 1-5.
- Lazăr, M., Vulpe, V., Gostin, I., Guguianu, E., Pașca, S., Lazăr, R. 2012. Epidemiologic, etiologic and lesional aspects of aeromonosis of cyprinids from the hydrographic basin of the Prut River, Romania. **Afr. J. Microb. Res.** 6(8), 1723-1729.
- Lower, K., Poet, S. 2001. Use of Enrofloxacin in the Treatment of Piscine Mycobacteriosis. **Small Animal/Exotics**, 623-628.
- Lui, Y.L., Lu, C.P. 2004. Role of *Ichthyophthirius multifiliis* in the Infection of *Aeromonas hydrophila*. **J. Vet. Med. B.**, 51, 222–224.
- Mehlhorn, H., Schmahl, G., Haberkorn, A. 1988. Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. Short communication. **Parasitol. Res.** 75, 64-66.
- MERCOSUL. 2012. Standards Mercosul to parasiticide products register. Regulation technic for licensing and renovation of the antiparasites products permission of veterinary use. Ordinance 048.h. 3p.
- Nordmo, R., Varma, K. J., Sutherland, I. H., Brokken, E. S. 2006. Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmon salar* L.: field evaluation of efficacy against furunculosis in Norway. **J. Fish Dis.** 17, 239–244.
- Nunes, B.G. 2007. Enfermidades dos peixes. Trabalho monográfico do curso de pós-graduação "Lato Sensu" em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal apresentado à UCB como requisito parcial para a obtenção de título de Especialista em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, 39 pp.
- Oliveira, A.M.B.M.S., Conte, L., Cyrino, J.E.P. 2004. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, Jaboticabal, 533 pp.
- Pádua, S.B., Martins, M.L., Carraschi, S.P., Cruz, C., Shikawa, M.M. 2012. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae): a new parasite for *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae). **Zootaxa**, 3422, 62–68.
- Picón-Camacho, S.M., Taylor, N.G.H., Bron, J.E., Guo, F.C., Schinn, A.P. 2012. Effects of Long duration, low dose bronopol exposure on the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), parasitizing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Vet. Parasit.** 186, 237 – 244.

- Schering-Plough Animal Health. 2009. Aquaflor. Florfenicol. Technical Monograph for catfish health professionals, 36 pp.
- Schmahl, G., Mehlhorn, H. 1988. Treatment of fish parasites 2. Effects of sym. Triazinona (toltrazuril) on monogenea. **Parasitol. Res.** 75, 132-145.
- Seljestokken, B., Bergh, O., Melingen, G.O., Rudra, H., Hetlilidolsen, R., Samuelsen, O.B. 2006. Treating experimentally induced vibriosis (*Listonella anguillarum*) in cod, *Gadus morhua* L., with florfenicol. **J Fish Dis.** 29, 737–742.
- Tomizawa, M., Casida, M.E. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annu. Rev. Entomol.** 48: 339-64.
- Xu, D.H., Shoemaker, C. A., Klesius, P.H. 2007. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **J. Fish Dis.** 30, 233–238.
- Yemmen C., Quilichini Y., Ktari M.H., Marchand B., Bahri S. 2011. Morphological, ecological and histopathological studies of *Trichodina gobii* Raabe, 1959 (Ciliophora: Peritrichida) infecting the gills of *Solea aegyptiaca*. **Protistol.** 6(4), 258-263.

### **MANUSCRITO 3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E HEMATOLÓGICA DE *P. mesopotamicus* APÓS TRATAMENTO COM FÁRMACOS**

Silvia Patrícia Carraschi<sup>1,2\*</sup>; Cynthia Venâncio Ikefuti<sup>1,2</sup>; Roberto Barbuio<sup>2</sup>, Taise Florêncio<sup>2</sup>; Claudinei da Cruz<sup>3</sup>, Maria José Tavares Ranzani-Paiva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Aquicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal. Via de Ac. Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/ nº, Zona Rural, Jaboticabal (SP), Brazil. CEP: 14884-900. Email: [patycarraschi@gmail.com](mailto:patycarraschi@gmail.com)

<sup>2</sup>Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Campus Jaboticabal (SP), Brazil

<sup>3</sup>Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (Unifeb), Barretos (SP), Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Pesca de São Paulo, São Paulo (SP), Brazil

**Revista: Veterinary Parasitology, ISSN: 1873-2550, Qualis A1**

#### **RESUMO**

Objetivou-se realizar avaliação hematológica e histopatológica de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após tratamento de *Aeromonas sp*, *Streptococcus sp*, com enrofloxacin (ENRO); *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina heterodontata* e *Anacanthorus penilabiatus* com toltrazuril (TOL), e de *Anacanthorus penilabiatus*, com thiamethoxan (TH). Para tanto, os peixes foram infestados naturalmente com os parasitos e submetidos ao tratamento com o TOL (3,0 mg L<sup>-1</sup>) ou TH (75,0 mg L<sup>-1</sup>), em banho terapêutico, e com os antibióticos adicionados na ração ENRO (90,0 mg. kg<sup>-1</sup>) ou FFC (10 mg kg<sup>-1</sup>). Ao final do tratamento foi coletado sangue por punção da veia caudal, para as análises hematológicas, além de amostras de tecidos de brânquias, fígado, rim e pele, para análise histopatológica. No experimento com TOL e ENRO, os peixes do controle infestado (CIn) demonstraram diminuição da hemoglobina, proteína total e cortisol, desestruturação das lamelas secundárias, assim como aumento do epitélio interlamelar. Porém, os peixes tratados não apresentaram alterações que diferem do controle sadio (CS). No experimento com TH e FFC, os peixes tratados apresentaram aumento do hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio e

concentração de hemoglobina corpuscular média, diminuição dos eritrócitos (RBC) e do cortisol porém, sem alterações histopatológicas. Estas alterações indicam hemoconcentração com desequilíbrio eletrolítico e a hemólise dos eritrócitos, mais Hb ficou disponível no plasma. As alterações apresentadas nos peixes do CIn, como aneurisma nas lamelas branquiais, podem levar o animal a morte. O uso de enrofloxacin e toltrazuril causa um estímulo imune dos pacus caracterizada por uma linfocitose e o uso de florfenicol e thiamethoxan causa hemoconcentração e desequilíbrio eletrolítico, porém são alterações transitórias que após a exposição e diminuição da carga dos patógenos, retornam aos valores normais.

**Palavras chave:** tratamento, antibióticos, quimioterápicos, sangue



### **MANUSCRIPT 3. HISTOPATHOLOGICAL AND HAEMATOLOGICAL EVALUATION OF *Piaractus mesopotamicus* AFTER TREATMENT WITH DRUGS**

#### **ABSTRACT**

The aims this research were to evaluate the hematological and histopathological evaluation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after *Aeromonas sp* and *Streptococcus sp* treatment, with enrofloxacin (ENRO) and florfenicol (FFC), and *Ichthyophytirius multifiliis* and *Trichodina heterodontata* treatment with toltrazuril (TOL), and after *Anacanthorus penilabiatus* treatment, with thiamethoxan (TH). For this, the animals were naturally infested with parasites and they were submitted at treatment with TOL (3.0 mg.L<sup>-1</sup>) or TH (75.0 mg.L<sup>-1</sup>), in therapeutic bath, and with antibiotics added in the food ENRO (90.0 mg. kg<sup>-1</sup>) or FFC (10 mg.kg<sup>-1</sup>). In the end of treatment the blood was collected by caudal vein puncture, for hematologic analysis and samples from gills, liver, kidney and skin, for histopathological analysis. With TOL and ENRO, fish from infested control (InC) showed decrease of Hb, Pt and cortisol, and secondary lamellae disruption and increase of interlamellae epithelium. Therefore treated fish didn't show changes. With TH and FFC, treated fish showed increase of Ht, Hb, VCM and CHCM and erythrocytes (RBC) and decrease of cortisol but without histopathological changes. These changes suggest hemoconcentration with electrolyte imbalance with the erythrocytes haemolysis, more Hb satys available in the bloodstone. The changes showed in INC, like aneurysm in the gill lamellae, can to lead the animal to death. Enrofloxacin and toltrazuril cause imune stimulus of pacus characterized by a lymphocytosis and florfenicol and thiamethoxan cause hemoconcentration and electrolyte imbalance, therefore these changes are temporary that, after exposure and decrease of load pathogens, return at normal values.

**Keywords:** treatment, antibiotics, chemotherapeutic, blood

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência de patógenos nos organismos de criação gera a necessidade do uso de xenobióticos, como fármacos, no tratamento das enfermidades. No Brasil há poucos fármacos com registro na aquicultura e isto proporciona o uso indiscriminado de muitos produtos químicos. Portanto a prospecção de moléculas para este fim é urgente para tornar o tratamento seguro para o ambiente e para o consumidor.

O antibiótico enrofloxacina (ENRO) tem um extensivo uso na medicina veterinária e o florfenicol (FFC) é registrado no Brasil para *Oreochromus niloticus* e *Oncorhynchus mykiss* (Schering-Plough, 2009). O toltrazuril (TOL) tem apresentado eficácia contra vários parasitos (Bermúdez et al., 2006). O thiamethoxan (TH) é um inseticida neonicotinóide (Tomizawa e Casida, 2003), não utilizado na aquicultura, mas selecionado para ser prospectada no controle de monogenéticos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

As análises complementares como a histologia e a hematologia após o tratamento são avaliações tão importantes quanto à toxicidade e a eficácia. Por meio dessas análises é possível verificar a higidez e se o fármaco afeta tecidos de grande importância (brânquias, fígado, rins e sangue), que possa comprometer seu posterior desenvolvimento.

As variáveis do sangue são consideradas indicadores fisiohistopatológicos de todo organismo, conseqüentemente com importância no diagnóstico do status estrutural e funcional do peixe exposto à substância tóxica (Adhikari et al., 2004).

O exame histopatológico é reconhecido cada vez mais como uma ferramenta valiosa para a avaliação do campo do impacto de poluentes ambientais em peixes (Teh et al., 1997). Lesões específicas que ocorrem nos órgãos de peixes expostos às substâncias tóxicas sob condições de laboratório ajudam a identificar biomarcadores de exposição.

Estas ferramentas são essenciais para a avaliação dos efeitos dos fármacos nos órgãos dos animais de criação após o tratamento (Carraschi et al., 2012).

Assim, objetivou-se avaliar as alterações histopatológicas e hematológicas de pacu (*P. mesopotamicus*) após tratamento de *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina heterodontata*, *Anacanthorus penilabiatus*, assim também como as bactérias (*Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp), com toltrazuril e enrofloxacina, e após tratamento

de *A. penilabiatu*s e as bactérias (*Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp), com thiamethoxan e florfenicol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os pacus infestados naturalmente com *I. multifiliis*, *T. heterodontata* e *A. penilabiatu*s, *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp foram submetidos ao tratamento com 3,0 mgTOL.L<sup>-1</sup> e 90,0 mgENRO.kg<sup>-1</sup> e os animais com *A. penilabiatu*s e *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp, tratados com 75 mgTH.L<sup>-1</sup> e 10 mgFFC.Kg<sup>-1</sup>, em condição de mesocosmo (tanque de 400 litros). Ao final de sete dias de ensaio foram coletadas amostras de sangue por punção da veia caudal, para análises hematológicas e tecidos (brânquias, fígado, rim e pele), para análises histopatológicas.

### 2.1 Análises hematológicas e bioquímicas

Os tratamentos utilizados nos experimentos foram: controle sadio (CS); controle infestado não tratado (CIn); controle sadio exposto aos fármacos na forma de tratamento (CEx) e os tratados (Tr), peixes doentes e submetidos ao tratamento com os fármacos.

Os animais foram anestesiados em benzocaína e o sangue foi coletado por meio de venopunção caudal de nove peixes de cada tratamento, com auxílio de seringa heparinizadas.

As amostras de sangue foram utilizadas para determinar o número de eritrócitos (RBC: *red blood cells*), contados em câmara de Neubauer, utilizando-se salina (0,7%) como diluente, hematócrito (Ht), pela técnica de microhematócrito, taxa de hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina, leitura realizada em espectrofotômetro e calculados os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média).

Para a contagem total e diferencial de leucócitos (Lc): monócitos (Mn), neutrófilos (Nt), eosinófilos (Eos), célula granulocítica especial (CGE), linfócitos (Lf), leucócitos imaturos (LIm) e contagem de trombócitos (Tr) foram confeccionadas lâminas de extensão sanguínea, coradas com MGGW (May Grünwald-Giemsa-Wright) pelo método de Rosenfeld (1947) obtendo-se o número absoluto de Lc e de Tr determinados pelo método indireto (Hrube e Smith, 1998).

As análises bioquímicas realizadas foram: proteínas totais, em refratômetro; glicose com leitura em Lactímetro YSI 2300 e cortisol por Elisa.

## **2.2 Análises histopatológicas**

Para análise histopatológica, foram coletadas amostras de tecido dos peixes infestados/infectados antes de iniciar o tratamento e após, de todos os tratamentos. Para tanto, nove peixes de cada tratamento foram eutanasiados em benzocaína e os fragmentos de brânquia, fígado, rins e pele coletados e imersos em solução aquosa fixadora de formaldeído a 10%, por 24 horas.

Após a fixação, os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em Histosec<sup>®</sup>. Em seguida, foram realizados cortes de 5 µm de espessura em micrótomo automático (Leica, RM-2155) e posteriormente corados com hematoxilina-eosina (H.E) e reação em ácido periódico de Schiff (P.A.S) (Behmer et al., 1976).

## **2.3 Análise dos dados**

Os ensaios foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três réplicas e 60 peixes por tratamento. Para a coleta de sangue e tecidos a escolha dos peixes amostrados (n=9/tratamento) foi aleatória. Os dados hematológicos foram analisados por análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando o programa Statistica.

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1 Análises hematológicas e bioquímicas do sangue de pacu após tratamento com Toltrazuril e Enrofloxacina**

O CIn refere-se aos peixes que apresentaram *A. penilabiatus* e *T. heterodontata* e não foram tratados durante experimento com TOL e ENRO. O número de trombócitos e o Ht não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1). O RBC não diferiu em relação ao CS, porém os peixes do CEx apresentaram o maior valor médio, diferindo do CIn e dos tratados, sendo que os tratados apresentaram um menor valor (Tabela 1).

O CIn apresentou 19% de redução de Hb em relação ao CS além de 10% de redução dos eritrócitos, apesar de não significativo (Tabela 1).

**Tabela 1. Valores médios  $\pm$  erro padrão das variáveis hematológicas de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, após tratamento com Toltrazuril e Enrofloxacina.**

Tratamentos	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g.dL <sup>-1</sup> )	Eritrócitos (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	Trombócitos ( $\mu$ L <sup>-1</sup> )
<b>Controle Infestado</b>	26,44 $\pm$ 0,66	7,60 $\pm$ 0,15 B	1,64 $\pm$ 0,16 B	24690,64 $\pm$ 2795,03
<b>Tratados</b>	27,11 $\pm$ 1,04	8,31 $\pm$ 0,25 AB	1,56 $\pm$ 0,21 B	23275,89 $\pm$ 3792,84
<b>Controle Sadio</b>	27,94 $\pm$ 1,05	9,27 $\pm$ 0,26 A	1,83 $\pm$ 0,25 AB	22923,29 $\pm$ 1835,32
<b>Controle Exposto</b>	27,66 $\pm$ 0,74	9,01 $\pm$ 0,35 A	1,92 $\pm$ 0,22 A	31552,28 $\pm$ 3474,33

Letras comparam as médias na coluna segundo teste de Tukey (P < 0,05). Eritrócitos = RBC (*red blood cells*). Controle Infestado: peixes com os patógenos sem tratamento. Controle Exposto: peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. Controle Sadio: peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.

Os monogenéticos são divididos em duas classes: Dactilogirídeos e Girodactilídeos, sendo *A. penilabiatu*s um representante Dactigorídeo (Boeger et al., 1995). A presença do monogenético *A. penilabiatu*s por meio da inserção dos ganchos, causa rompimento dos vasos (Jerônimo et al., 2013), o que leva à diminuição da hemoglobina (Tabela 1) e da proteína total (Tabela 4), caracterizando um quadro de anemia.

Além disso, os pacus apresentavam *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp, bactérias que causam diminuição da hemoglobina. Os peixes diminuem hemoglobina mediante infecção bacteriana para restringir a disponibilidade de ferro, pois estes patógenos necessitam destes elementos para sua proliferação, sendo uma estratégia pra sobrevivência (Wooldridge e Willians, 1993).

Em relação aos índices hematimétricos, não ocorreu diferença significativa (Tabela 2).

**Tabela 2. Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Toltrazuril e Enrofloxacina.**

Tratamentos	Volume corpuscular médio (fL)	Concentração hemoglobina corpuscular média (g.dL <sup>-1</sup> )
<b>Controle Infestado</b>	172,11 $\pm$ 8,29	28,87 $\pm$ 0,78
<b>Tratados</b>	166,05 $\pm$ 6,78	30,89 $\pm$ 1,05
<b>Controle Sadio</b>	155,33 $\pm$ 10,11	33,56 $\pm$ 1,59
<b>Controle Exposto</b>	145,13 $\pm$ 5,53	32,72 $\pm$ 1,45

Controle Infestado: peixes com os patógenos sem tratamento. Controle Exposto: peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. Controle Sadio: peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.

A Hb, RBC, CHCM e VCM do CIN, caracterizam uma medida compensatória, pois mediante diminuição das células vermelhas (RBC) e da Hb, são geradas novas células, que são maiores (aumento do VCM) com menor quantidade de Hb das mesmas (diminuição do CHCM), as quais não foram suficientes para gerar um aumento do Ht.

Os números absolutos de leucócitos e de linfócitos foram significativamente maiores nos tratados, enquanto que os eosinófilos, menores nos peixes do CEx. Os de Mn, de Nt, de CGE e de leucócitos imaturos dos tratamentos não diferiram do CS (Tabela 3).

**Tabela 3. Valores médios e erro padrão do número absoluto de leucócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Toltrazuril e enrofloxacina**

Células ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Controle Infestado	Tratados	Controle Sadio	Controle Exposto
<b>LeucT</b>	15498,46±1969,61 B	25031,90±3921,911 A	12859,73±1284,07 B	10247,54±1558,48 B
<b>Mono</b>	814,37±134,90 A	519,16±124,95 AB	464,59±135,91 AB	278,22±82,51 B
<b>Neut</b>	283,59±123,13	218,80±81,95	346,22±108,10	172,21±70,24
<b>Eos</b>	155,16±65,13 AB	134,36±41,55 AB	330,49±118,78 A	10,55±5,31 B
<b>Linf</b>	13924,39±1818,46 B	23720,49±3572,97 A	11541,87±1282,10 B	9723,78±1472,27 B
<b>CGE</b>	57,98±26,40	124,16±58,09	77,77±51,94	0,00 ± 0,00
<b>Leuclm</b>	262,97±92,53	338,70±193,85	98,78±45,94	62,78±34,89

Letras comparam as médias dos tratamentos nas linhas segundo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). LeucT: leucócitos totais; Mono: monócitos; Neut: neutrófilos; Eos: eosinófilos; Linf: linfócitos; CGE: célula granulocítica especial; Leuclm: leucócito imaturo. Controle Infestado: peixes com os patógenos sem tratamento. Controle Exposto: peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. Controle Sadio: peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.

Os pacus tratados com fármacos apresentaram uma imunidade melhor caracterizada por uma linfocitose semelhante ao trichlorfon em *Cyprinus carpio* (Ranzani-Paiva et al., 1987) e diferente do diflubenzuron no tratamento de *Lernaea cyprinacea* em *Rhamdia quelen* que não alterou o padrão hematológico (Mabilia e Souza, 2006). O efeito individual dos fármacos (CEx) e dos patógenos (CIN) não causaram diferença estatística em relação às células brancas, mas os tratados apresentaram um efeito sinérgico com aumento das mesmas caracterizada por leucocitose e linfocitose. A principal função dos leucócitos é a defesa do organismo

contra a ação de bactérias ou corpos estranhos que penetram nos tecidos (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Os valores de Eos verificados nos peixes do CS é característica inerente da espécie (Ranzani-Paiva et al., 1999). Porém, a eosinopenia, diminuição de 96% dos Eos no CEx e de 59% nos tratados, sugere não ser um distúrbio, uma vez que a ausência ou a baixa incidência destas células no sangue de teleósteos é normal (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Em relação às variáveis bioquímicas, a glicemia não apresentou diferença significativa em relação ao CS. Em relação à Pt ocorreu 9% de redução e o cortisol diminuição de 67% no CIn, diferindo do CS (Tabela 4).

**Tabela 4. Valores médios e erro padrão das variáveis bioquímicas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratado com Toltrazuril e Enrofloxacin.**

Tratamentos	Glicose (mmol.L <sup>-1</sup> )	Proteína Total (g.dL <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	Cortisol (µg.dL <sup>-1</sup> )
<b>Controle Infestado</b>	5,26 ± 0,44	5,59 ± 0,10 B	3,08 ± 0,54 C
<b>Tratados</b>	4,70 ± 0,38	5,98 ± 0,08 AB	5,28 ± 0,35 BC
<b>Controle Sadio</b>	4,39 ± 0,55	6,16 ± 0,18 A	9,42 ± 2,23 AB
<b>Controle Exposto</b>	4,82 ± 0,47	5,84 ± 0,16 AB	10,32 ± 1,21 A

Letras comparam as médias na coluna segundo teste de Tukey (P < 0,05). Controle Infestado: peixes com os patógenos sem tratamento. Controle Exposto: peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. Controle Sadio: peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.

O cortisol foi dosado oito dias após o início do ensaio e a última aplicação dos fármacos ocorreu pela manhã do sétimo dia. Além disso, o CIn apresentou carga de parasitos diminuída em relação ao início do ensaio, em que o *I. multifiliis* não foi encontrado, porém os demais patógenos permaneceram. Este quadro caracterizou uma exaustão fisiológica dos animais, que não responderam ao aumento do cortisol mediante aos fatores estressantes (aplicação do fármaco e presença de patógenos). O cortisol é um indicador primário de resposta ao estresse e sua alteração é detectada em poucos minutos após exposição ao fator estressante (Marino et al., 2001). Martins et al (2000) também não encontraram resposta satisfatória em pacu submetidos a

injeção consecutivos de salina e carragenina em pacu, indicando que os animais deixam de elevar o cortisol após estresse consecutivo.

A dosagem da glicose sangüínea é um método valioso no diagnóstico de estresse fisiológico em peixes (Acerete et al., 2004). A mobilização da glicose está relacionada com a utilização de fonte de energia extra para o animal superar um distúrbio e seu aumento é verificado após estresse agudo ou captura (Lappivaara, 2001). Apesar de não significativo, ocorreu um aumento de 22% na glicose plasmática do CIn, sugerindo uma maior mobilização de energia, apesar do cortisol não caracterizar a carga de parasitos como fator estressante neste tratamento.

Os fármacos utilizados no tratamento das doenças podem alterar o padrão sanguíneo do peixe (Chagas et al., 2006) e isto depende do grupo químico a qual pertence, da dose/concentração, tempo de exposição, estado nutricional, etc. Os peixes que foram tratados com TOL e ENRO apresentaram linfocitose, o que é mudança transitória no padrão sanguíneo durante o tratamento, que retorna ao estado normal assim que cessa a exposição ao fármaco.

A diminuição da Hb e de RBC observadas no CIN compromete o desenvolvimento do peixe, uma vez que a Hb está presente nas células vermelhas e transporta oxigênio. Na ausência de tratamento os peixes podem apresentar deficiência respiratória e isso levar a morte. Assim, a utilização dos fármacos no tratamento das enfermidades garante o sucesso da cadeia produtiva e diminui as perdas econômicas causadas pelas altas taxas de mortalidade causada pelos patógenos. Estudos envolvendo a eficácia em condição de campo e quantificação de resíduo na carne do pescado e no ambiente são necessários para dar continuidade em um possível processo de regulamentação do uso desses fármacos na aquicultura brasileira.

### **3.2 Análises hematológicas e bioquímicas do sangue de pacu após tratamento com Thiamethoxan e Florfenicol**

Os peixes do CEx apresentaram 30% de diminuição nos trombócitos em relação ao CS (Tabela 5), e os tratados, um aumento de 19% no Ht e 35% de Hb, apresentando também diminuição de 18% no RBC, diferindo do CS. O CIn apresentou diminuição da hemoglobina e de eritrócitos (Tabela 5).



Tabela 5. Valores médios e erro padrão das variáveis hematológicas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Thiamethoxan e Florfenicol.

Tratamentos	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g.dL <sup>-1</sup> )	Eritrócitos (10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	Trombócitos (μL <sup>-1</sup> )
<b>Controle Infestado</b>	27,94±1,06 B	9,27±0,27 D	1,83±0,08 AB	28273,22±2704,29 A
<b>Tratados</b>	33,22±0,62 A	15,91±0,53 A	1,56±0,07 B	25067,26±1536,21 AB
<b>Controle Sadio</b>	27,83±0,71 B	11,70±0,60 C	1,92±0,08 A	28156,93±1304,94 A
<b>Controle Exposto</b>	30,88±0,89 AB	13,77±0,55 B	1,64±0,05 B	19506,04±1892,06 B

Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste de Tukey (P < 0,05). \*Eritrócitos = RBC (*red blood cells*). Controle Infestado: peixes com os patógenos sem tratamento. Controle Exposto: peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. Controle Sadio: peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos e tratados com os fármacos.

Em relação aos índices hematimétricos, o VCM indicou que os tratados apresentaram eritrócitos com maior volume e maior CHCM. O CIn, um leve aumento do VCM e uma diminuição significativa do CHCM (Tabela 6).

Tabela 6. Valores médios e erro padrão dos índices hematimétricos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Thiamthoxan e Florfenicol.

Tratamentos	Volume corpuscular médio (fL)	Concentração hemoglobina corpuscular média (g.dL <sup>-1</sup> )
<b>Controle Infestado</b>	155,32±10,12 BC	33,56±1,59 C
<b>Tratados</b>	216,80±11,40 A	47,82±0,86 A
<b>Controle Sadio</b>	146,99±7,85 C	41,94±1,54 B
<b>Controle Exposto</b>	189,97±8,56 AB	44,69±1,63 AB

Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste de Tukey (P < 0,05). Controle Infestado: peixes com os patógenos sem tratamento. Controle Exposto: peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. Controle Sadio: peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.

Os tratados e o CEx apresentaram os menores valores de RBC (Tabela 5), sugerindo que o TH e o FFC causam hemólise dos eritrócitos, assim como a cipermetrina causa em *Labeo rohita* (Adhikari et al., 2004), o diazinon em *C. carpio* (Banaee et al., 2008) e o permanganato de potássio em *O. niloticus* (França, 2009).

O aumento de Hb, CHCM e Ht e a diminuição do RBC indica uma hemoconcentração com desequilíbrio eletrolítico o que ocasionou aumento do volume

dos eritrócitos, que incharam sofrendo hemólise, aumentando a Hb. Também pode ocorrer uma variação no conteúdo de hemoglobina e no tamanho dos eritrócitos como estratégia de adaptação aos estressores. Ikefuti (2012) também observou hemoconcentração em pacu após tratamento de *T. heterodontata* com teflubenzuron. Porém *Cyprinus carpio* com alimentação contendo praziquantel apresentaram diminuição de RBC, Hb e VCM, retornando aos níveis normais após 96 de exposição (Sudová et al., 2008). As alterações nos peixes tratados são transitórias e possibilitam a sobrevivência, com retorno ao padrão normal após exposição aos fármacos.

Na contagem total e diferencial dos leucócitos, os peixes do CIn apresentaram leucopenia, linfocitopenia, eosinopenia e neutrofilia, diferindo do CS (Tabela 7). Segundo Tavares-Dias et al. (2001) linfocitopenia é resposta característica de estresse, neste caso, uma imunossupressão causada pela presença dos patógenos (Lim et al., 2003). Este estresse é indicado pelos valores de cortisol que foram maiores no CIn, apesar de não diferir do CS (Tabela 7).

Células granulocíticas especiais, monócitos e leucócitos imaturos não diferiram do CS, porém no CIN não foi encontrada CGE (Tabela 7).

**Tabela 7. Valores médios e erro padrão de leucócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Thiamethoxan e Florfenicol.**

Células ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	Controle Infestado	Tratados	Controle Sadio	Controle Exposto
<b>LeucT</b>	6214,98±983,82 B	8049,44±1106,8 AB	13138,43±2642,36 A	10749,83±1009,43 AB
<b>Mono</b>	500,66±114,42	493,73±104,69	331,93±65,72	636,23±82,91
<b>Neut</b>	678,29±193,11 A	384,76±8060 AB	146,16±34,67 B	496,35±96,75 AB
<b>Eos</b>	132,26±44,43 B	202,48±46,46 AB	594,26±189,81 A	398,954±79,42 AB
<b>Linf</b>	4859,37±728,37 B	6783,04±943,5 AB	11760,77±2418,98 A	7961,35±1358,82 AB
<b>CGE</b>	0,00±0,00 B	80,26±23,03 AB	86,773±31,33 AB	108,67±34,02 A
<b>Leuclm</b>	83,00±19,83	164,34±71,21	139,28±28,75	142,47±30,71

Letras comparam as médias na linha segundo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). LeucT: leucócitos totais; Mono: monócitos; Neut: neutrófilos; Eos: eosinófilos; Linf: linfócitos; CGE: célula granulocítica especial; Leuclm: leucócito imaturo. Controle Infestado: peixes com os patógenos sem tratamento. Controle Exposto: peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. Controle Sadio: peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.

O quadro de imunossupressão no CIN causada pelos patógenos (*A. penilabiatu*s, *Aeromonas* sp e *Streptococcus* sp) também foi verificado por Achuthan

Nair e Balakrishnan Nair (1983) em *Channa striatus* causado por *Alitropus typus*; por Höglund et al. (1992) em *Anguilla anguilla* causado por *Anguillicola crassus*; por Tavares-Dias et al. (1998) em *O. niloticus* causado por *I. multifillis* e *Saprolegnia* sp. e por Tavares Dias et al. (2002) em *O. niloticus* causado por ictiofitiríase.

Em relação às variáveis bioquímicas, o CEx apresentou um aumento de 19% de proteína total diferindo do CS. A quantificação de Pt plasmática engloba globulina, fibrinogenina e albumina que são vitais no transporte de materiais no sangue (Inyang et al., 2010) e um aumento pode estar relacionado a dano ou disfunção tecidual, como verificado por Oner et al. (2008) em *O. niloticus* exposto a Ag.

O CIN apresentou os maiores valores de cortisol apesar de não diferir do CS (Tabela 8). Este estresse causa uma imunossupressão nos peixes (Castro e Fernandes, 2009) e a um maior gasto de energia, como observado na histologia do fígado desses animais (pouco glicogênio nos hepatócitos) (Figura 7B). Os tratados não diferiram do CS em relação ao cortisol, isto demonstra que a presença dos fármacos TH e FFC não causam estresses nos animais submetidos a eles.

Os peixes do CEx apresentaram os maiores valores de glicose diferindo do CS (Tabela 8), o que sugere que ocorreu um aumento da demanda energética, mobilizando mais glicose pela gliconeogênese (Heydarnejad et al., 2013) para a metabolização dos fármacos.

**Tabela 8. Valores médios e erro padrão das variáveis bioquímicas de pacus, *Piaractus mesopotamicus* tratados com Thiamethoxan e Florfenicol.**

Tratamentos	Glicose (mmol.L <sup>-1</sup> )	Proteína total (g.dL <sup>-1</sup> )	Cortisol (µg.dL <sup>-1</sup> )
<b>Controle Infestado</b>	6,12±0,48 AB	3,02±0,13 A	68,32±9,35 A
<b>Tratados</b>	4,72±0,56 B	2,74±0,15 AB	36,78±4,58 BC
<b>Controle Sadio</b>	4,31±0,33 B	2,53±0,08 B	54,65±8,77 AB
<b>Controle Exposto</b>	7,45±0,79 A	2,68±0,05 AB	14,04±2,67 C

Letras comparam as médias na coluna segundo teste de Tukey (P< 0,05). CIn: controle infestado. CS: controle sadio. CEx: controle exposto. Pt: proteína total. Controle Infestado: peixes com os patógenos sem tratamento. Controle Exposto: peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. Controle Sadio: peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.

O aumento da glicose plasmática como fonte de energia para a manutenção da homeostase, é uma resposta comum em peixes sob alguma condição de estresse, como verificado nos peixes expostos (CEx). A mobilização das reservas energéticas,

por vias endócrinas, pode ser considerado mecanismo adaptativo que permite ao organismo aumento na demanda energética durante exposição a fatores estressantes (Martinez e Cólus, 2002, Oner et al., 2008). O aumento na glicose plasmática também foi observada em *O. mykiss* exposto ao cobre (Heydarnejad et al., 2013).

O cortisol é um indicador primário de resposta ao estresse e sua alteração é detectada em poucos minutos após o estresse (Marino et al., 2001). O cortisol foi dosado oito dias após o início do experimento, ou seja, os peixes tratados se acostumaram com o manejo diário da aplicação do fármaco. Em relação ao CIn, a diminuição da carga de *I. multifiliis* e a presença dos demais patógenos, após oito dias, não permitiu que os peixes respondessem ao aumento de cortisol, indicando exaustão fisiológica.

As alterações observadas nos peixes tratados são transitórias e reversíveis, pois o organismo consegue retornar ao estado normal após o tratamento com os fármacos proporcionando diminuição da carga de patógenos. As alterações do CIn, diminuição de Hb e CHCM, dificultam o transporte de oxigênio, podendo causar a sua morte. Dessa forma a utilização de fármacos com concentração, tempo de exposição e dias de tratamento padronizados, proporciona sucesso do ciclo de produção e diminuição das perdas pelas altas taxas de mortalidade causada pelos patógenos.

### **3.3 Análises histopatológicas de *Piaractus mesopotamicus* após tratamento com toltrazuril e enrofloxacina**

#### **3.3.1 Brânquias**

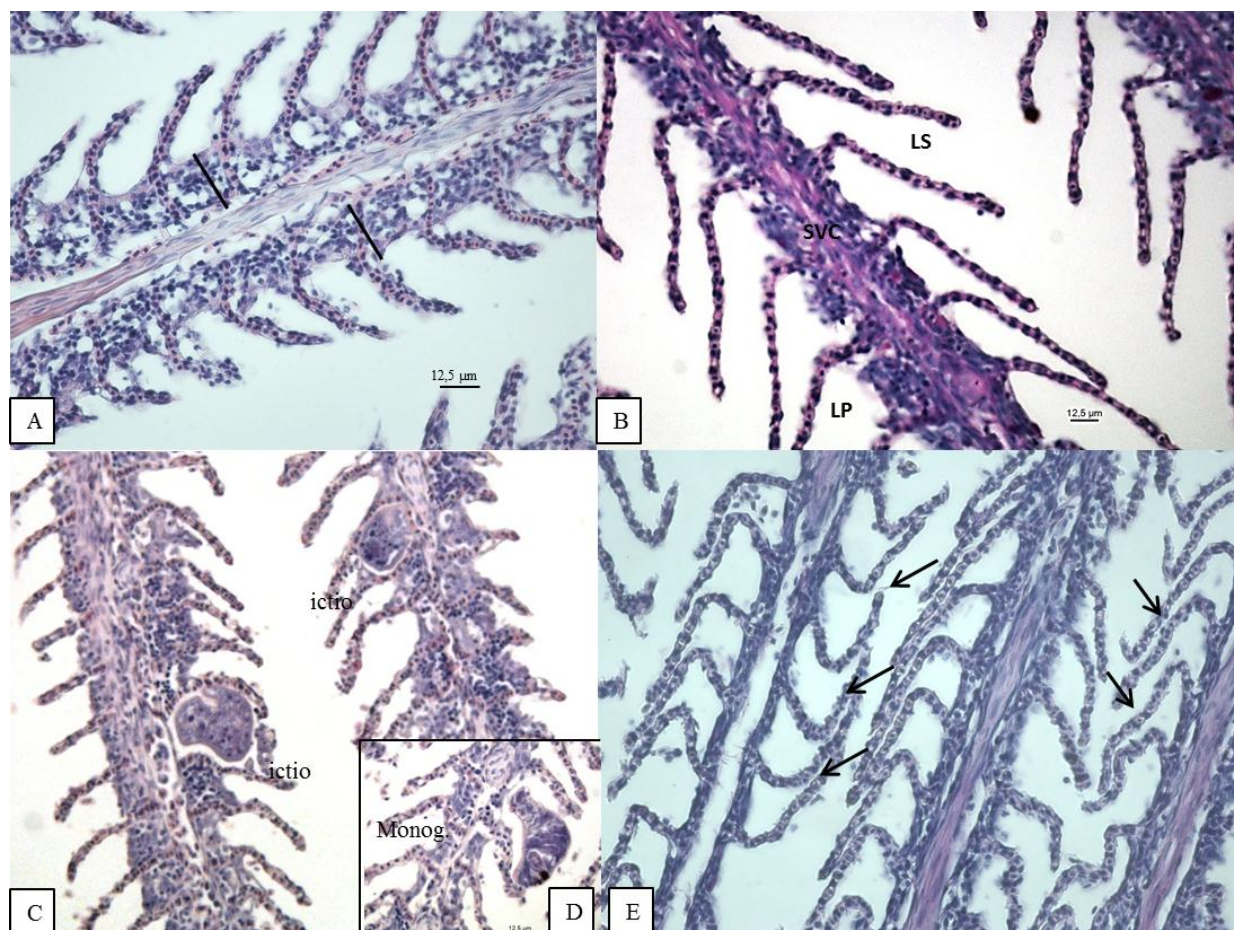
As brânquias de pacu são formadas por dois conjuntos de quatro arcos branquiais e cada arco é composto por lamelas primárias de onde partem as lamelas secundárias que são constituídas por células de revestimento, mucosas, pilares e cloretos (Figura 1B).

Os peixes infestados/infectados antes de iniciar o tratamento e do CIn apresentaram mudanças que comprometem a sobrevivência dos animais e presença de *I. multifiliis* e *A. penilabiatus* (Tabela 9 e Figuras 1C e 1D). Os animais tratados desenvolveram aumento do epitélio interlamelar, sendo esta alteração transitória e reversível após exposição (Figura 1A) e o CEx, desestruturação das lamelas secundárias (Figura 1E).

**Tabela 9. Alterações em brânquias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* em ensaio com toltrazuril e enrofloxacina no controle de ectoparasitos e bactérias.**

Situações	Doentes	CIn	CEx	Tratados	CS
Monogenéticos: <i>A. penilabiatus</i>	X	X			
<i>I. multifiliis</i>	X				
Desestruturação da lamela secundária	X	X	X		
Hiperplasia de células mucosas, de revestimento e cloreto	X	X		X	
Aumento do epitélio interlamelar	X	X		X	

\*Doentes: peixes infestados e infectados antes de iniciar o tratamento. CIN (Controle Infestado): peixes com os patógenos sem tratamento. CEx (Controle Exposto): peixes saudáveis expostos aos fármacos na forma de tratamento. CS (Controle Sadio): peixes saudáveis sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.



**Figura 1.** Fotomicrografias de brânquias de *Piaractus mesopotamicus*. Em A, peixe que foi Tratado com os fármacos. B, o Controle Sadio. C, antes de iniciar o tratamento. D, o Controle infestado e em E, Controle exposto. Linha: aumento do epitélio interlamelar. SVC: seio venoso central. LP: lamela primária. LS: lamela secundária, Ictio: *Ichthyophthirius multifiliis*, Monog.: monogenético *Anacanthorus penilabiatus*. Setas: Desestruturação das lamelas secundárias. Coloração HE.

As alterações observadas nas brânquias dos peixes doentes e CIn, como aumento do epitélio interlamelar devido a hiperplasia das células mucosas, de cloreto e de revestimento, são respostas da presença dos patógenos *I. multifiliis*, *T. heterodontata* e *A. penilabiatus* e bactérias. O *I. multifiliis* causa hiperplasia e hipertrofia do filamento branquial secundário em *O. mossambicus* (Subasinghe, 1990), em *I. punctatus* (Maki et al., 2001), em jundiá (Carneiro et al., 2006) e em *Gymnocorymbus ternetzi* (Aydoğan et al., 2010) e *A. hydrophila* em pacu (Carraschi et al., 2012). Os patógenos, parasitos e bactérias, causam alterações graves nos tecidos/órgãos dos peixes, prejudicando captação de oxigênio, metabolização absorção, excreção, etc. Estas alterações podem causar altas taxas de mortalidade e grandes prejuízos econômicos sendo indispensável o uso de fármacos no tratamento.

Segundo Mallatt (1985) o aumento do número de células mucosas provoca hipersecreção de muco, que visa a proteção da estrutura tecidual em situações ambientais adversas e em exposição a agentes tóxicos. As mucossubstâncias produzidas por estas células apresentam poliânions, que podem atuar como barreira protetora contra a penetração do xenobiótico ou patógeno no epitélio respiratório do pacu. Esse mecanismo de defesa foi observado nos pacus como forma de proteção do epitélio branquial contra os patógenos (CIn).

Como a diminuição dos espaços interlamelares em função dos parasitos, que limita a área de superfície disponível para trocas gasosas, o organismo reage com aumento do número de células epiteliais vizinhas para melhorar a captação de oxigênio (Moreira et al., 2001). A hiperplasia das células secretoras de muco também foi observada nas brânquias de salmão do atlântico (*Salmo salar*) tratado com levamisol (Morrison et al., 2001). Assim, este tipo de alteração não é específico para um determinado xenobiótico ou patógeno e sim um mecanismo inato de defesa que o organismo encontra para continuar vivo.

A desestruturação das lamelas secundárias observadas nos peixes do CEx foi causada pela exposição aos fármacos e nos peixes do CIn e nos doentes (antes de iniciar o ensaio), pela presença dos patógenos. *A. hydrophila* causa desestruturação das lamelas secundárias em pacu (Carraschi et al., 2012), e foi caracterizada como uma das bactérias presentes no pacu em associação aos ectoparasitos.

### 3.3.2 Fígado e Rins

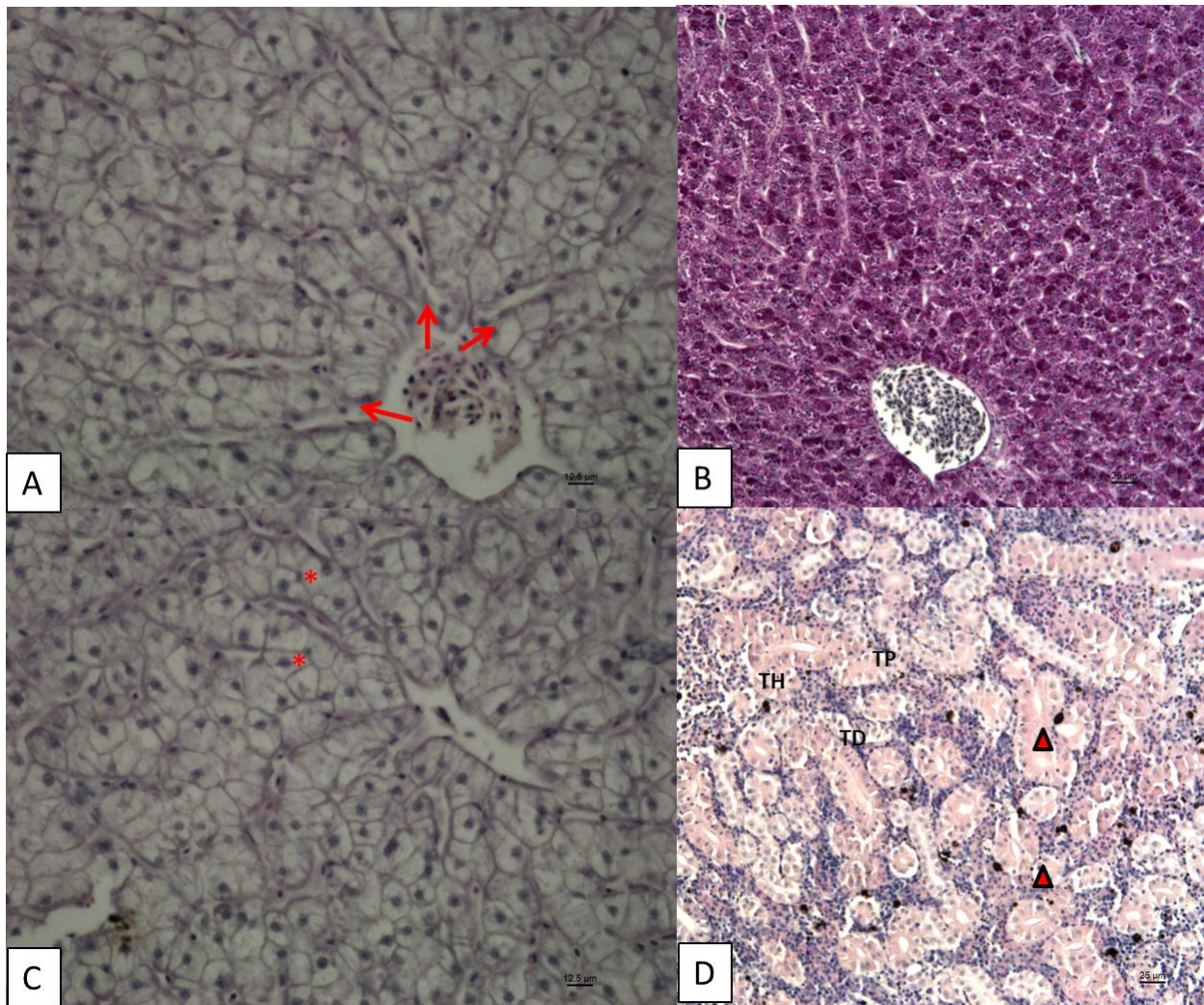
O fígado de pacu é constituído por hepatócitos com formato hexagonal, com núcleo central, citoplasma acidófilo e presença de grânulos de glicogênio, estando dispostos em arranjo cordonal e são envoltos por capilares sinusóides.

Os peixes do CIn, os tratados e o CEx apresentaram aumento do diâmetro dos capilares sinusóides além de hipertrofia dos hepatócitos (Figura 2A e 2C).

O glicogênio dos hepatócitos foi verificado em maior quantidade nos peixes do CIn e os tratados (Figura 2B). No CEx apresentou disposição polar, com parte do citoplasma claro, indicando utilização do material de reserva na região em contato com os capilares sinusóides, ou seja, em contato com o xenobióticos presente no sangue, e o outro extremo com glicogênio estocado. Este material de reserva foi mobilizado para ser utilizado na metabolização dos fármacos (Carraschi et al., 2012).

Os rins de pacu são constituídos por túbulos proximais e distais, tecido hematopoiético envolvendo esses túbulos, centro melanomacrófagos e glomérulos dentro da cápsula glomerular. Os peixes de todos os tratamentos apresentaram características histológicas semelhante ao controle (Figura 2D).





**Figura 2.** Fotomicrografias de fígado e rins de *Piaractus mesopotamicus*. Em A peixe com patógenos antes de iniciar o tratamento. B, o Controle Infestado. C, peixe Tratado. e D, Rim de peixe tratado. Seta: aumento do diâmetro dos capilares. Glicogênio nos hepatócitos. Asterisco: hipertrofia dos hepatócitos. TP: túbulos proximais, TD: túbulos distais. TH: tecido hematopoiético. Cabeça de seta: centro melanomacrófagos. Coloração PAS em B, as demais, HE.

Os peixes infestados/infectados amostrados antes de iniciar o experimento, do CIn, CEx, e os tratados apresentaram hipertrofia dos hepatócitos e aumento do diâmetro dos capilares sinusóides. A hipertrofia é indicativo de aumento da atividade enzimática para metabolizar os fármacos e/ou as paredes celulares, toxinas das bactérias, caracterizando similaridade ao que foi observado em pacu infectados com *A. hydrophila* e tratados com FFC e oxitetraciclina (Carraschi et al., 2012).

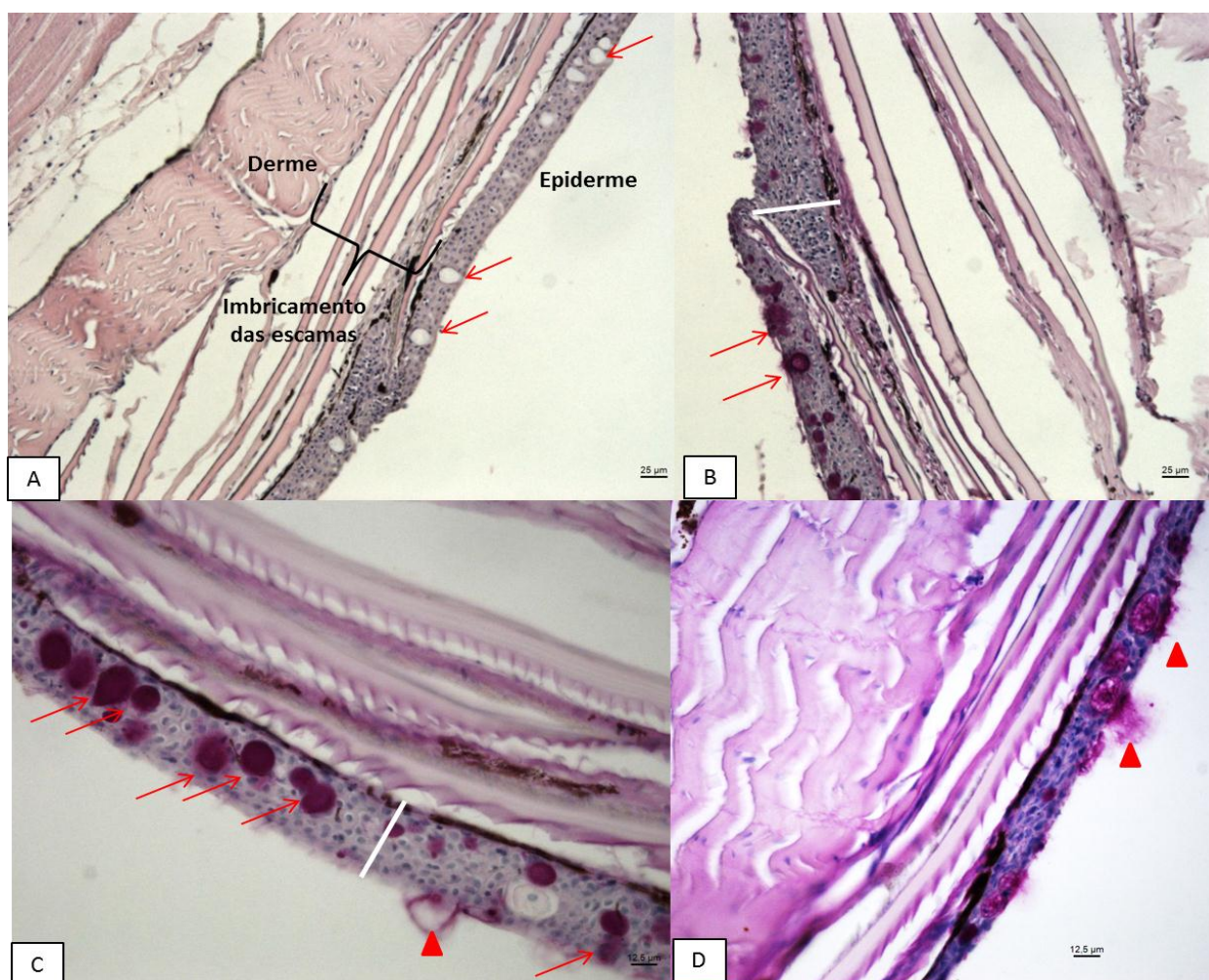
Neste estudo não foi observada alteração no tecido hepático de pacu que possa comprometer seu desenvolvimento, mesmo nos CIn, assim como Maki et al., (2001) em *Ictalurus punctatus* infestados com *I. multifiliis*. Isto pode ter ocorrido porque a



infestação foi aguda, mas não tão severa. Em condições de doença crônica, os peixes doentes manifestam alterações severas, levando os peixes a óbito.

### 3.3.3 Pele

A pele de pacu (controle) apresenta epiderme constituída por três camadas de células pavimentosas com núcleos centrais, células mucosas secretoras de muco substâncias e cromatóforos abaixo da epiderme. As escamas estão implantadas abaixo da epiderme atingindo a derme, sendo esta formada por uma espessa camada de tecido conectivo modelado com fibras colágenas dispostas horizontalmente (Figura 3A). Os peixes tratados e CIn apresentaram hiperplasia das células epidérmicas e mucosas, aumentando a espessura da epiderme. Essas alterações são decorrentes dos parasitos presentes na epiderme (Figura 3B, 3C e 3D). Nos demais tratamentos a histomorfologia foi semelhante ao CS.



**Figura 3.** Fotomicrografias de pele de *Piactus mesopotamicus*. Em A, peixe do Controle Sadio, B e C, Controle infestado. D: Tratado. Setas: células mucosas, Cabeça de seta: muco substâncias. Retas: espessamento da epiderme. A. Coloração HE, as demais, PAS.

O hospedeiro aumenta a produção de muco por meio da proliferação de células mucosas, para diminuir o dano causado pela presença de *I. multifiliis* (Matthews, 2005).

As alterações histopatológicas nos peixes tratados não comprometem o desenvolvimento dos animais de cultivo, sendo que a utilização desses fármacos no tratamento de enfermidades possibilita que os peixes de criação alcancem o final do ciclo e assim, garantam o sucesso da atividade aquícola.

### 3.4 Histopatologia de *Piaractus mesopotamicus* após tratamento com florfenicol e thiamethoxan

#### 3.4.1 Brânquia

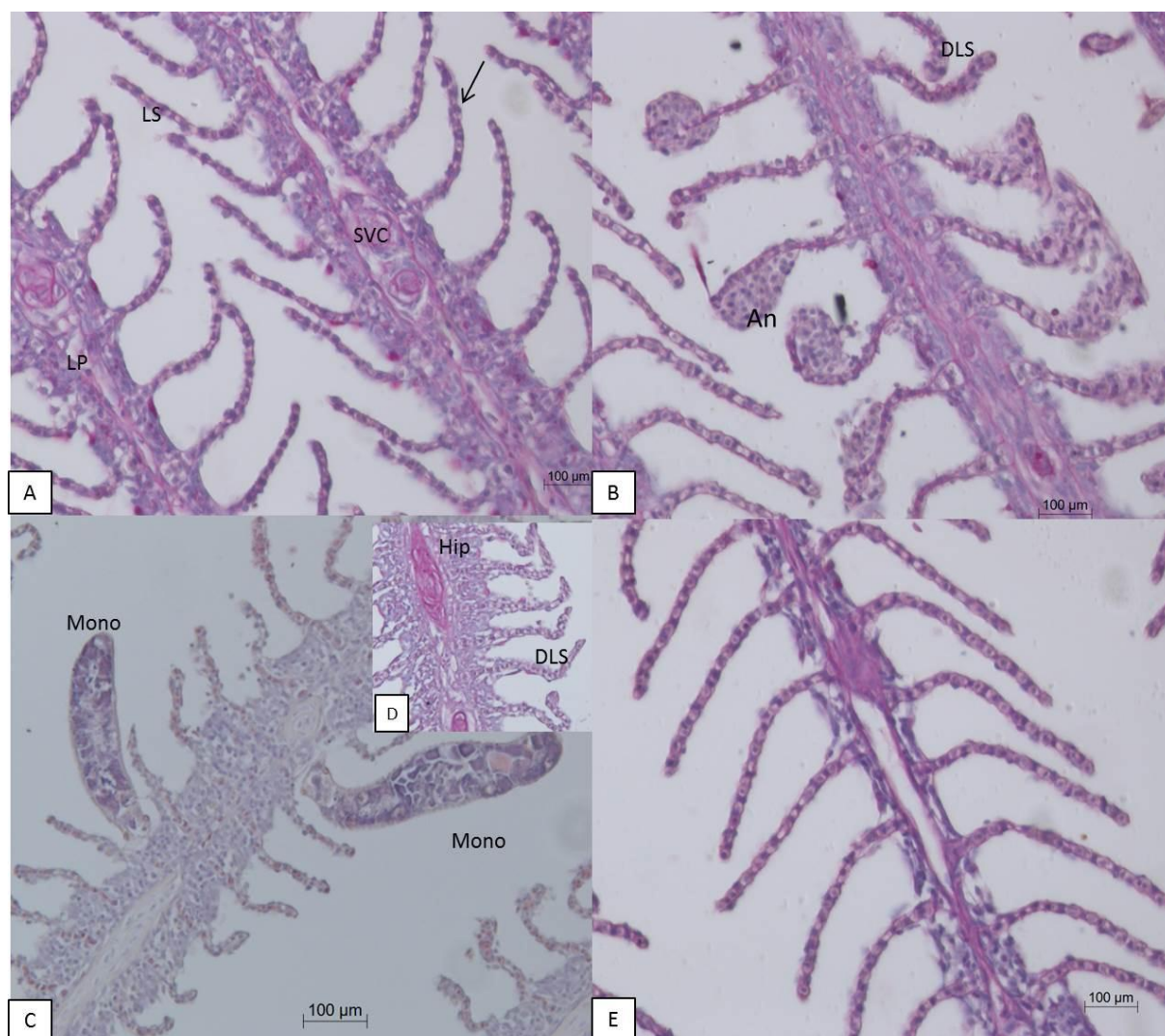
As brânquias de pacu são formadas por dois conjuntos de quatro arcos branquiais posicionados abaixo do opérculo. Cada um deles é composto por lamelas primárias por onde partem as secundárias e que são constituídas por células de revestimento, mucosas, pilares e cloreto (Figura 4A).

Os peixes do CIn e os doentes, antes de iniciar o tratamento, apresentaram várias alterações na histomorfologia das brânquias (Tabela 10, Figura 4C, D); os peixes do CEx, apresentaram pequenos aneurismas e desestruturação das lamelas secundárias (Figura 4B). Em contrapartida, os peixes tratados não apresentaram alteração, histomorfologia similar a dos peixes sadios (Tabela 10 e Figura 4E).

**Tabela 10. Alterações em brânquias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* em ensaio com TH+FFC no controle de monogenéticos e bactérias.**

Situações	Doentes	CIn	CEx	Tratados	CS
Ectoparasitos monogenéticos	x	x			
Desestruturação da lamela secundária	x	x	x		
Hiperplasia de células mucosas, de revestimento e cloreto	x	x			
Aumento do epitélio interlamelar	x	x			
Aneurisma	x	x	x		

Doentes: peixes infestados e infectados antes de iniciar o tratamento. CIn (Controle Infestado): peixes com os patógenos sem tratamento. CEx (Controle Exposto): peixes sadios expostos aos fármacos na forma de tratamento. CS (Controle Sadio): peixes sadios sem exposição aos fármacos e aos patógenos. Tratados: peixes com os patógenos, tratados com os fármacos.



**Figura 4.** Fotomicrografias de brânquias de *Piaractus mesopotamicus*. Em A. Brânquias de pacu do CS. B. CEX. C e D. Cln. E. Tratados com TH+FFC. LP: lamela primária. LS: lamela secundária. SVC: seio venoso central. Seta: células pilares. An: aneurisma. DLS: desestruturação da lamela secundária. Mono: monogenéticos. Hip: hiperplasia interlamelar. A, B, D, E: coloração PAS. C: coloração HE.

As alterações observadas nos peixes doentes, antes de iniciar o tratamento e no Cln, como aneurisma e desestruturação das lamelas, comprometem o seu desenvolvimento e podem causar a morte. A hiperplasia causa o aumento do epitélio interlamelar, o que aumenta a distância de difusão do oxigênio da água para o sangue. Esta alteração, de forma crônica e o aneurisma, dificultam ou impossibilitam a absorção de oxigênio (Roberts, 2001).

Segundo Mallatt (1985) o aumento do número de células mucosas provoca hipersecreção de muco, que visa à proteção da estrutura tecidual em situações ambientais adversas e em exposição a agentes tóxicos. Esse mecanismo de defesa foi

observado nos pacus como forma de proteção do epitélio branquial contra os patógenos.

A desestruturação da lamela secundária das brânquias, observada nos peixes no CEx, é um tipo de alteração reversível, que após o período de tratamento, em que a água é renovada, retorna à sua morfologia normal (Lupi et al., 2007). Os animais quando expostos a compostos químicos, mudanças patológicas podem ocorrer num curto espaço de tempo, as quais são reversíveis até certo ponto (Rand e Petrocelli, 1985).

### **3.4.2 Fígado e Rins**

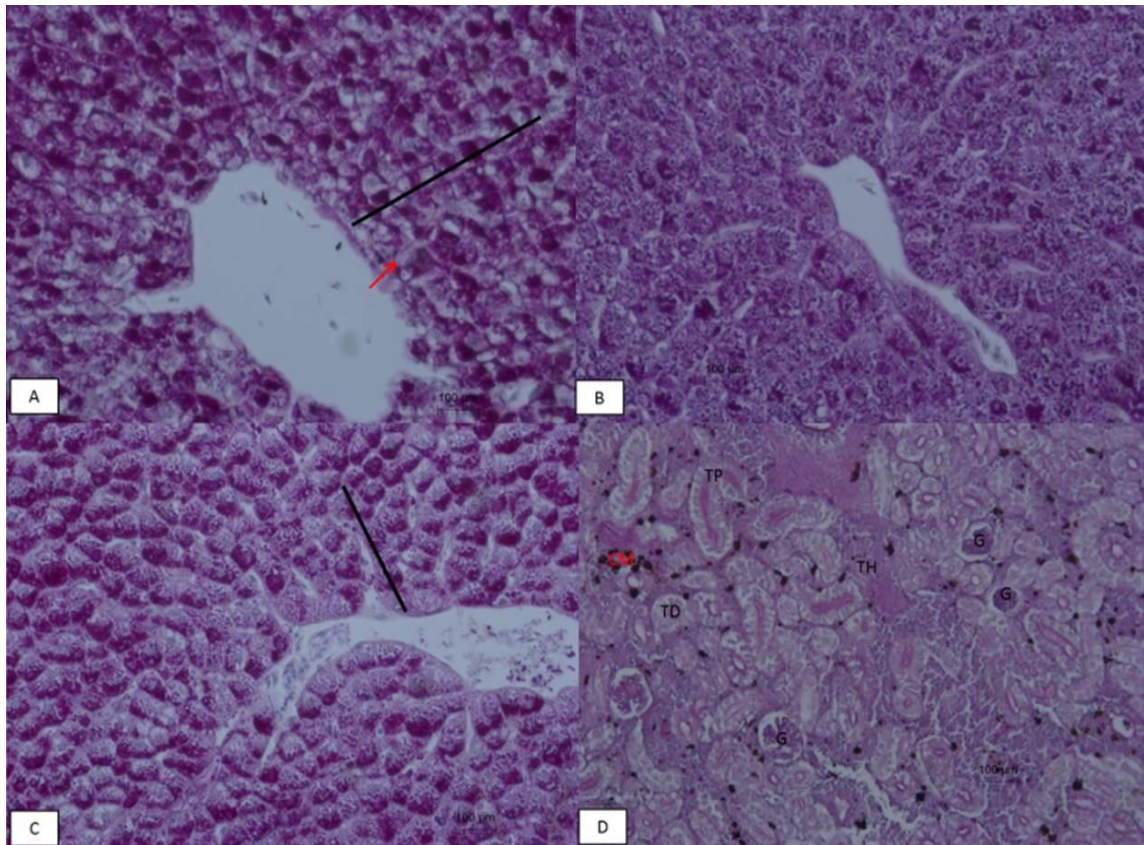
O fígado de pacu é constituído por hepatócitos, os quais apresentam formato hexagonal, com núcleo central, citoplasma acidófilo e presença de grânulos de glicogênio. Os hepatócitos estão dispostos em arranjo cordonal e são envolvidos por capilares sinusóides (Figura 5A).

Os peixes do CEx e dos tratados com TH+FFC apresentaram glicogênio polarizado no citoplasma do lado inverso dos capilares (Figura 5C), indicando que esta reserva energética estava sendo utilizado para auxiliar na metabolização dos fármacos (Carraschi et al., 2012).

Os peixes do CIn apresentaram pouco glicogênio nos hepatócitos, indicando que os mesmos estavam utilizando esse material de reserva, em decorrência do estresse pela presença dos patógenos (Figura 5B). As alterações como redução do estoque de glicogênio podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, considerados indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (Teh et al., 1997).

Os rins de pacu são constituídos por túbulos proximais e distais, glomérulos dentro da cápsula glomerular, centro melanomacrófagos e tecido hematopoiético (Figura 5D). Os peixes dos demais tratamentos não apresentaram alteração na histomorfologia dos rins, sendo similar ao controle.





**Figura 5.** Fotomicrografias de fígado e rins de *Piaractus mesopotamicus*. Em A, controle sadio. B, Controle Infestado. C, Tratados e em D, Rins de pacu tratados. Linha: Arranjo cordonal dos hepatócitos. Seta: capilares sinusóides. TP: túbulo proximal. TD: túbulo distal. TH: tecido hematopoiético. CM: centro melanomacrófagos. G: glomérulo dentro da capsula glomerular. Note em B: pouco glicogênio nos hepatócitos e em C: glicogênio polarizado dentro do hepatócitos. D: coloração HE, as demais, PAS.

Assim, o toltrazuril e a enrofloxacin causam um estímulo imune nos pacus tratados, caracterizado por uma linfocitose e o florfenicol e o thiamethoxan, hemoconcentração e desequilíbrio eletrolítico. Porém são alterações que retornam ao estado normal após a exposição e que aliada à eficácia dos fármacos com a morte dos patógenos, possibilitam o sucesso da cadeia produtiva diminuindo as perdas pelas altas taxas de mortalidade causada pelos patógenos.

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

O toltrazuril é moderadamente tóxico com o *Hyphessobrycon eques* como *endpoint* e bioindicador da sua toxicidade, é eficaz contra *Ichthyophthirius multifiliis* e *Trichodina heterodontata* em *Piaractus mesopotamicus* e não apresenta risco ao pacu durante o tratamento, porém causa médio risco ambiental ao bioindicadores.

O thiamethoxan é moderadamente tóxico e também tem o *Hyphessobrycon eques* como *endpoint* e bioindicador da sua toxicidade, é eficaz contra *Anacanthorus penilabiatus* em *Piaractus mesopotamicus*, porém apresenta alto risco de intoxicação para *P. mesopotamicus* e os bioindicadores durante o tratamento.

O florfenicol é pouco tóxico, com a *Lemna minor* como *endpoint* e bioindicador da sua toxicidade, é eficaz contra *Aeromonas* sp. e *Streptococcus* sp. em *Piaractus mesopotamicus* e não apresenta em risco ao pacu e aos bioindicadores.

A enrofloxacin é pouco tóxica, com a *Pomacea canaliculata* como *endpoint* e bioindicador da sua toxicidade, é eficaz contra *Aeromonas* sp. e *Streptococcus* sp. em *Piaractus mesopotamicus*, porém apresenta alto risco para o pacu e os bioindicadores.

O tratamento com toltrazuril, em banho, associado à enrofloxacin, na ração, causa um estímulo imune caracterizado por uma linfocitose em *Piaractus mesopotamicus* e não causa alterações histopatológicas.

O tratamento com thiamethoxan, em banho, associado ao florfenicol, na ração, causa hemoconcentração e desequilíbrio eletrolítico transitórios, aliada a diminuição da carga dos patógenos, com indicação de efetivo controle, e não causa alterações histopatológicas.

## 5. REFERÊNCIAS

- Acerete, L.; Balasch, J.C.; Espinosa, E.; Josa, A.; Tort, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aqu.**, 237, 167-178.
- Achuthan Nair, G.; Balakrishnan Nair, N. 1983. Effect of infestation with the isopod, *Alitropus typus* M. EDWARDS (CRUSTACEA: FLABELLIFERA: AEGIDAE) on the haematological parameters of the host fish, *Channa striatus* (BLOCH). **Aqu.**, 30, 11-19.
- Adhikari, N.P.; Pehg, X.; Alizadeh, A.; Ganti, S.; Nayak, S.K.; Kumar, S.K. 2004. Multiscale modeling of the surfactant mediated synthesis and supramolecular assembly of cobalt nanodots. **Phys. Rev. Lett.**, 93, 18301- 18304.
- Aydoğan, A.; Hamdi, A.V.C.I.; Birincioğlu, S.S. 2010. Ichthyophthirius multifiliis Infection in A Black Tetra (*Gymnocorymbus ternetzi*). **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.**, 16(1), p 135-137.
- Banaee, M.; Mirvagefei, A.R.; Rafei, G.R.; Majazi, A.B. 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. **Int. J. Envir. Res.**, 22, 189-198.
- Behmer, A.O.; Tolosa, E.M.C.; Feritas-Neto, A.G. 1976. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart., 239p.
- Bermúdez, A.R.; Alemañ, B.N.; Vigliano, A.C.F.; Vásquez, A.S.; Quiroga, M.I.; Nieto, A.J.M. 2006. Effects of symmetric triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Enteromyxum scophthalmi* parasitizing turbot (*Scophthalmus maximus* L.): A light and electron microscopic study. **Aqu.**, 254, 65–71.
- Boeger, W.A.; Husack, W.S.; Martins, M.L. 1995. Neotropical monogenoidea. 25. *Anacanthorus penilabiatu*s n. sp. (Dactylogyridae: Anacanthorinae) from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg,1887), cultivated in the State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 90 (6), 699-701.
- Carneiro, P.C.F.; Cirio, S.M.; Schorer, M. 2006. Estudo anatomopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por *Ichthyophthirius multifiliis* e submetidos a tratamentos convencionais. **Arch. Veter. Sci.**, 11(1), 33-38.

Carraschi, S.P; Cruz, C., Machado Neto, J.G., Ignácio, N. F.; Barbuio, R.; Machado. M.R.F. 2012. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. **Ecot. Envir. Saf.** 83, 115–120.

Castro, F.L.; Fernandes, M.N. Efeito da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismo de defesinata em peixes cultivados. In: Tavares-Dias, M. (Org.) **Manejo e Sanidade de peixes em cultivo**. Macapá. Embrapa Amapá., 361-388.

Chagas, L. P.; Joyeux, J.C.; Fonseca, F.R. 2006. Small-scale spatial changes in estuarine fish: Subtidal assemblages in tropical Brazil. **J. Mar. Biol. Assoc. UK**, 8, 861 – 875.

França, J.G. 2009. Toxicidade aguda e crônica do permanganato de potássio em *Oreochromis niloticus*, *Ceriodaphnia dubia* e *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Tese** apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UNESP (CAUNESP), como parte das exigências para a obtenção do Título de DOUTOR em Aquicultura, área de concentração em Aquicultura. 96p.

Heydarnejad, M.S.; Khosravian-Hemami , M.; Nematollahi, A.; Rahnama, S. 2013. Effects of copper at sublethal concentrations on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Intern. Ver. Hydrob**, 98, 71–79.

Hrube, T. C.; Smith, S. 1998. Hematology of fish. In: **Schalm`s Veterinary Hematology**, 5a. ed., 1120-1125.

Höglund, J.; Andersson J.; Hardig, J., 1992. Haematological responses in the European eel, *Anguilla anguilla* L., to sublethal infestation by *Anguillicola crassus* in a thermal effluent of the Swedish Baltic. **J. Fish Dis.**,15, 507-514.

Ikefuti, C.V. 2010. **Hematologia e ecotoxicidade do teflubenzuron no controle de *Trichodina* sp. em peixes**. Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Unesp – Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura. 88p.

Inyang, I.R.; Daka, E.R.; Ogamba, E.N., 2010. Effects of sub-lethal concentrations of diazinon on total protein and transaminase activities in *Clarias gariepinus*, Current Research. **J. Biol. Sci.** 2, 290–295.



Jerônimo, G.T., Pádua, S.B., Bampi, D., Gonçalves, E.L.T., Garcia, P., Ishikawa, MM., Martins, M.L. 2013. The host-parasite relationship analysis of the monogenean *Anacanthorus penilabiatus* (Dactylogyridae) infesting *Piaractus mesopotamicus*, a South American fish. **Braz. J. Biol.** In press.

Lappivaara, J., 2001. Effects of acute handling stress on White fish *Coregonus lavaretus* after prolonged exposure to biologically treated and untreated bleached Kraft mill effluent. **Arch. Environ. Cont. Tox.**, 41, 55 – 64.

Lim, L. C.; Dhert, P.; Sorgeloos, P. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. **Aquac. Res.**, 34, 923-935.

Lupi, C.; Nhacarini, N. I.; Mazon, A. F.; Sá, O. F. 2007. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe On Line**, n.3, 6p.

Mabilia, R G; Souza, S M G. 2006. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Sci. Biol. Sci.**, Maringá, 28(2), 159-163.

Maki, J.L.; Brown, C.C., Dickerson, H.W. 2001. Occurrence of *Ichthyophthirius multifiliis* within the peritoneal cavities of infected channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Dise. Aqu. Organ.** 44, 41–45.

Mallatt, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Can. J. Fish. Aqu. Sc.**, 42, 630-648.

Marino, G., Di Marco, P., Mandich, A., Finoia, M.G., Cataudella, S. 2001. Changes in serum cortisol, metabolites, osmotic pressure and electrolytes in response to different blood sampling procedures in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **J. of Appl. Ichth.** 17, 115-120.

Martins, M.L.; Moraes, F.R., Moraes, J.R.E., Malheiros, E.B. 2000. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Act. Scien.** 22(2), 545-552.

- Martinez, C.B.R.; Cólus, I.M.S. 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: Medri, M.E.; Bianchini, E.; Morrison, R.N.; Nowak, B.F., Carsom. J. 2001. The histopathological effects of alevamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aqu.**, 195, 23-33.
- Matthews, R. A. 2005. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriosis in fresh water teleosts. **Adv. Paras.**, 59, 160-241.
- Moreira, H.L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R.P. 2001. Zimmermann, S. **Fundamentos da moderna aqüicultura**. Canoas: Editora ULBRA, 200p.
- Oner, M.; Atli, G.; Canli, M., 2008. Changes in serum parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. **Environ. Toxicol. Chem.**, 2, 360–366.
- Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. (Eds.) 1985. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington; Hemisphere Pub, 283-331.
- Ranzani-Paiva, M.J.T.; Ishikawa, C.M.; Portella, M.C.; Ceriberto, R.J. 1987. Hematologia da carpa, *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfonato de 0,0-Dimitil- Oxi-2,2,2-Tricoloetilo (Neguvon). **Bol. Inst. Pesca**, 14, 83-92.
- Roberts, R.J. 2001. **Fish Pathology**. London: W.B. Saunders, 472 p.
- Rosenfeld, G. 1947. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantã**, v. 20, p. 315-328.
- Schering-Plough Animal Health. 2009. Aquaflor. Florfenicol. **Technical Monograph for catfish health professionals**, 36 p.
- Subasinghe, R.P. 1990. Descriptive Pathology of controlled infections of the ciliate ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 in *Oreochromis mossambicus* (Peters) fry. **Asian Fish. Sc.**, 3, 309-317.

Sudová, E.; Piacková, V.; Kroupová, H.; Pijáček, M.; Svobodova, Z. 2008. The effect of praziquantel applied per os on selected haematological and biochemical indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Fis. Bioch.**, 35(4), 599-605.

Tavares-Dias, M.; Rodrigues, C.A.P.; Martins, M.L; Moraes, F.R. 1998. Efeitos da ictiofitiríase branquial e da saprolegniose sobre parâmetros hematológicos de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae). In: **Encontro brasileiro de patologia de organismos aquáticos**, 5, 1998, Maringá. Anais. Maringá: Abrapoa.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R.; Martins, M. L.; Santana, A.E. 2002. Haematological changes in *Oreochromis niloticus* (osteichthyes: cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, 28(1), 1 – 9.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F. R. 2004. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: M., Tavares-Dias, 144 p.

Teh, S.J.; Adams, S.M.; Hinton, D.E. 1997. Histopatologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aqu. Toxic.**, 37, 51–70.

Tomizawa, M.; Casida, M.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annu. Rev. Entomol.**, 48, 339-364.

Wooldridge, K.G., Williams, P.H. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. **FEMS Microb. Rev.**, 4(2), 325–348.