



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



HEMATOLOGIA E ECOTOXICIDADE DO TEFLUBENZURON NO CONTROLE DE *TRICHODINA* SP. EM PEIXES

Bióloga: Cynthia Venâncio Ikefuti

Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Unesp – Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



HEMATOLOGIA E ECOTOXICIDADE DO TEFLUBENZURON NO CONTROLE DE *TRICHODINA* SP. EM PEIXES

Bióloga: Cynthia Venâncio Ikefuti

Orientadora: Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva

Co-orientador: Dr. Eduardo Makoto Onaka

Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Unesp – Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo

2012

Dedico

***Ao meu filho Caio Henrique Ikefuti de Castro,
que desde pequeno convive com a distância.***

“Você precisa se encher de confiança. A confiança conquista.”

Felipe Pavani

Agradecimentos

À Deus, por me dar essa chance ímpar de ingressar em uma pós graduação e me dar saúde para que esse trabalho pudesse ser realizado e finalizado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva, por aceitar o desafio, pela oportunidade e principalmente pela orientação, em que seus ensinamentos sempre agregaram conhecimento.

Ao meu corientador, Dr. Eduardo Makoto Onaka “Twin”, por me aceitar como sua estagiária em 2009, me auxiliar e ser o início de todo esse caminho que eu percorri.

Ao meu “Boss” e amigo, Prof. Dr. Claudinei da Cruz, por me ensinar a definição de equipe e a importância da rotina em um laboratório. Por sua presença, paciência, (muitas) broncas, conselhos e ensinamentos nos momentos em que eu duvidei da minha capacidade durante esse percurso. Serei eternamente grata a você “Chefe” por ter me ajudado em todas as fases da minha jornada.

Aos melhores amigos, irmãos e companheiros de trabalho que uma pessoa pode ter: Naiara, Jéssica, Taise, Joani, Aline, Roberto, Natalia, Letícia, Adilson, Alfredo, Neto, Milena, Edson, Lê e Ronaldo. Daniela, Carimi, Daniel e Marina, que não estão mais no NEPEAM também. Graças a vocês eu sei o que é ter saudades do trabalho. Saibam que eu não conseguiria sem vocês. Muito obrigada pessoal.

À dupla dinâmica Patrícia e Cristina, por me ajudarem em praticamente todas as fases do meu mestrado: desde a histologia à estatística. Mas principalmente por me ensinarem que é possível não ter apenas colegas de trabalho, e sim AMIGAS de trabalho.

À Profa Márcia Machado por permitir que pudéssemos realizar a histologia em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Caunesp, Márcio, Márcio Perereca, Valdecir, Donizeti e Sr. Mauro por me ajudarem sempre que eu precisei. David e Veralice, meus anjos da

guarda, que sempre me socorreram, me auxiliando e orientando em relação a parte burocrática da pós graduação.

Aos queridos: Marina, Dárcio, Michelle, Bruno, Felipe e Diego. Obrigada pela amizade, conselhos, brincadeiras, broncas. Obrigada por me atenderem de madrugada para ouvirem os meus desabafos e, principalmente, por me ensinarem o verdadeiro sentido da palavra amigo.

Ao meu amigo e companheiro Tulíbio, pela paciência, companheirismo e principalmente pelo carinho. Por me ouvir e me aconselhar nos momentos de dúvida e por me alegrar e me confortar nos momentos de tristeza.

À minha amiga Hânia Cardamoni Godoy, por ter plantado na minha cabeça a idéia de fazer pós graduação e me fazer acreditar que esse sonho era possível.

À minha família em jabuca: Thálita, Thais, Tifanni e o mascotinho Felipe pelas risadas, broncas e pela paciência e compreensão nos momentos cruciais do meu trabalho.

Ao meu pai Kazuo, minha mãe Ivone, minhas irmãs Michelle e Priscilla e meu padrinho Dr. Olímpio, pela confiança em mim depositada e pelo apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos da pós - graduação pelos incansáveis grupos de trabalho, dias de estudo, e a todos que de alguma maneira contribuíram durante essa caminhada.

Este projeto teve bolsa de mestrado fornecida pela CAPES.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de Tabelas.....	V
Índice de Figuras.....	Vi
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Objetivos.....	7
Referências Bibliográficas.....	8
Capítulo 1. Segurança ambiental do inseticida teflubenzuron para os organismos não-alvo <i>Daphnia magna</i>, <i>Lemna minnor</i>, <i>Pomacea canaliculata</i> e <i>Hyphessobrycon eques</i>.....	10
Resumo.....	10
1. Introdução e Objetivos.....	11
2. Material de métodos.....	14
2.1 Toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i>	14
2.2 Toxicidade aguda para <i>Lemna minnor</i>	15
2.3 Toxicidade aguda para <i>Hyphessobrycon eques</i> e <i>Pomacea canaliculata</i>	16
3. Resultados e Discussão.....	17
4. Conclusão.....	21
5. Referências Bibliográficas.....	21
Capítulo 2. Aspectos ecotoxicológicos e histopatologia do inseticida Teflubenzuron em pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i>.....	24
Resumo.....	24
1. Introdução e Objetivos.....	25
2. Material e Métodos.....	27
2.1 Ensaios de toxicidade aguda.....	27

2.2 Ensaio de toxicidade crônica e análise histopatológica.....	28
2.3 Risco de intoxicação ambiental.....	31
3. Resultados e Discussão.....	31
3.1 Ensaio de toxicidade aguda e crônica.....	31
3.2 Descrição histopatológica.....	36
3.2.1 Brânquias	37
3.2.2 Fígado.....	39
3.2.3 Rins.....	41
4. Conclusão.....	43
5. Referências Bibliográficas.....	43
Capítulo 3. Eficácia do inseticida teflubenzuron para <i>Trichodina</i> sp. em pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> e tilápia <i>Oreochromis niloticus</i>.....	49
Resumo.....	49
1. Introdução e Objetivos.....	50
2. Material e métodos.....	52
2.1. Infestação parasitária e contagem basal.....	52
2.2. Procedimento Experimental.....	53
3. Resultados e Discussão.....	54
4. Conclusão.....	59
5. Referências Bibliográficas.....	59
Capítulo 4. Alterações hematológicas em pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> expostos ao inseticida teflubenzuron.....	62
Resumo.....	62
1. Introdução e Objetivos.....	63
2. Material de métodos.....	64
3. Resultados e Discussão.....	66
4. Conclusão.....	71

5. Referências Bibliográficas.....	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76

ÍNDICE DE TABELA

Capítulo 1. Segurança Ambiental do inseticida Teflubenzuron para os organismos não-alvo *Daphnia magna*, *Lemna minnor*, *Pomacea canaliculata* e *Hyphessobrycon eques*.....

Tabela 1. Valores da CL50/CE50 do TFB para *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Hyphessobrycon eques* e *Pomacea canaliculata*..... **17**

Tabela 2. Valores da CL50 para os peixes *P.mesopotamicus*, *P. reticulata*, *C. carpio* e *O. mykiss*..... **18**

Tabela 3. Valores das variáveis físicas e químicas da água durante o teste de toxicidade aguda do Teflubenzuron para o mato grosso, *H. eques*..... **20**

Tabela 4. Valores das variáveis físicas e químicas da água durante o teste de toxicidade aguda do Teflubenzuron para o caramujo, *P. canaliculata*..... **20**

Capítulo 2. Aspectos ecotoxicológicos e histopatologia do inseticida Teflubenzuron em pacu, *Piaractus mesopotamicus*.....

Tabela 1. Valores de quociente e concentração utilizados no ensaio de toxicidade crônica do TFB para o pacu, *P. mesopotamicus*..... **30**

Tabela 2. Valores da CL50 do TFB para as espécies de peixes *P. mesopotamicus*, *P. reticulata*, *C. carpio* e *O. mykiss*..... **32**

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas da água durante o teste de toxicidade aguda do Teflubenzuron para o pacu, *P. mesopotamicus*..... **34**

Tabela 4. Variáveis físicas e químicas da água durante os dias de avaliação do ensaio de toxicidade crônica do teflubenzuron para o pacu, *P. mesopotamicus*..... **35**

Capítulo 3. Eficácia do inseticida teflubenzuron para *Trichodina* sp. em pacu, *Piaractus mesopotamicus* e tilápia *Oreochromis niloticus*.....

Tabela 1. Valores médios do número de *Trichodina* sp./peixe e porcentagem de eficácia após o tratamento com o TFB em pacu, *P. mesopotamicus* e tilápia *O. niloticus*..... **55**

Tabela 2. Sobrevivência durante o experimento de eficácia do TFB para o pacu, *P. mesopotamicus* e tilápia *O. niloticus*..... **56**

Tabela 3. Valores das variáveis de qualidade de água durante o ajuste de dose resposta do TFB para o pacu, *P. mesopotamicus*..... **56**

Tabela 4. Valores das variáveis de qualidade de água durante o ajuste de dose resposta do TFB para a tilápia, *O. niloticus* **57**

Capítulo 4. Alterações hematológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* expostos ao inseticida teflubenzuron.....

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros da série vermelha de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> exposto ao TFB.....	68
Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros da série branca de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> exposto ao TFB.....	69
Tabela 3. Valores das variáveis físicas e químicas da água durante a exposição do teflubenzuron para o pacu, <i>P. mesopotamicus</i>	70

ÍNDICE DE FIGURA

INTRODUÇÃO.....	
Figura 1. Fórmula estrutural do teflubenzuron.....	4
 Capítulo 2. Aspectos ecotoxicológicos e histopatologia do inseticida Teflubenzuron em pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i>.....	
Figura 1. Fotomicrografia de cortes transversais de brânquias de pacu. A. Controle. LP: Lamela primária, Setas: Lamelas secundárias. B. CL50/10. Estrela: estase. Aumento de 40X. Coloração HE. Barra de 1,0 cm = 34,5 µm.....	38
Figura 2. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> . A. Controle demonstrando os capilares sinusóides (estrela). B. CL50/5. Seta: hipertrofia e núcleo deslocado para a periferia. C. CL50/10. Linha: Arranjo cordonal dos hepatócitos. Aumento de 40X. Coloração HE. Barra de 1,0 cm = 34,5 µm.....	40
Figura 3. Fotomicrografia de cortes transversais de rins de pacu. A. controle TD: túbulo distal; TP: túbulo proximal; Gl: glomérulo. B. CL50/5. Seta: glomérulos se desprendendo da cápsula glomerular. Aumento de 40X. Coloração HE. Barra de 1,0 cm = 34,5 µm.....	42
 Capítulo 4. Alterações hematológicas em pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> expostos ao inseticida teflubenzuron.....	
Figura 1. Leucócitos presentes nos peixes do controle. Er: Eritrócito Mn: monócito; Tb: trombócito; Es: eosinófilo; Nt: neutrófilo. Coloração Rosenfeld. Aumento 1000X.....	70
Figura 2. Leucócitos presentes nos peixes expostos ao TFB. Er: Eritrócito CGE: célula granulocítica especial. Mn: monócito; Tb: trombócito; Nt: neutrófilo; Lf: linfócito. Coloração Rosenfeld. Aumento 1000X.....	70

RESUMO

Os parasitos podem causar perdas significativas na produção de peixes e para controlar estas doenças  necessário o uso de farmoquímicos, como o teflubenzuron (TFB), um inseticida que pode ser utilizado no controle de parasitos de peixes. A etapa inicial do processo de avaliação da viabilidade de um farmoquímico (eficácia terapêutica)  verificar a toxicidade inerente do ingrediente ativo do composto ou da formulação, sua segurança clínica e risco de intoxicação ambiental. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade aguda e a segurança ambiental do TFB, para a *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata* e para os peixes pacu, *Piaractus mesopotamicus* e mato-grosso, *Hyphessobrycon eques*; avaliar a toxicidade crônica e os efeitos histopatológicos do TFB para o pacu; ajustar a concentração de eficácia do TFB no controle de *Trichodina* sp. em pacu e tilápia, *Oreochromis niloticus*; monitorar as variáveis físicas e químicas da água e avaliar as possíveis alterações hematológicas do pacu exposto ao TFB. A toxicidade aguda do TFB para *D. magna* foi elevada ($CE_{50};48h = 0,17 \mu g.L^{-1}$) e praticamente não tóxico para *L. minor*, *P. mesopotamicus*, *P. canaliculata* e *H. eques* ($CL_{50} > 1000,0 mg.L^{-1}$). O TFB não apresenta toxicidade para as espécies avaliadas, demonstrando ausência risco de intoxicação ambiental para o pacu, sendo eficaz no controle de *Trichodina* sp nas concentrações de $80,0 mg.L^{-1}$ e $50,0 mg.L^{-1}$ para pacu e tilápia, com redução no número de parasitos de 96,10% e 87,86% respectivamente. O TFB também causou leucocitose no quadro hematológico de pacu.

Palavras chaves: Ecotoxicidade, farmoquímico, tratamento, organismos não-alvo.

ABSTRACT

The parasites can cause significant losses in the fish production and to control these diseases is necessary the use of the phamochemicals, like the teflubenzuron (TFB), an insecticide that can use in the control of parasites of fish. The initial stage of the process of assessment of viability of a pharmochemical (therapeutic efficacy) is verify the inherent toxicity of the active ingredient of the compound or formulation, your clinical security and environmental intoxication risk. Thus, the aims of this research were to evaluate the acute toxicity and the environmental security of TFB, for *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata* and fish pacu, *Piaractus mesopotamicus* and mato-grosso, *Hyphessobrycon eques*; to evaluate the chronic toxicity and the histopathological effects of FB for pacu; to adjust the effectiveness concentration of TFB in the control of *Trichodina* sp. in pacu and tilapia, *Oreochromis niloticus*; to monitor the physical and chemical variables from water and to evaluate the possible hematological changes of pacu exposed at TFB. The acute toxicity of TFB for *D. magna* was high ($EC_{50;48h} = 0.17 \mu g.L^{-1}$) and non-toxic practically for *L. minor*, *P. mesopotamicus*, *P. canaliculata* and *H. eques* ($LC_{50} > 1000.0 mg.L^{-1}$). TFB doesn't show toxicity for the species evaluated, realizing away environmental intoxication risk for pacu, being efficacy in the control of *Trichodina* sp in the concentrations of $80,0 mg.L^{-1}$ and $50,0 mg.L^{-1}$ for pacu and tilapia, with reduction in the parasites number of 96,10% and 87,86%, respectively. TFB caused decrease of leucocytes in the hematology variables of pacu.

Key words: Ecotoxicity, pharmonochemical, treatment, non-target organisms.

INTRODUÇÃO

A produção intensiva de organismos aquáticos é caracterizada pela alta densidade de estocagem e arraçoamento, manejo intensivo. Esses fatores aumentam a possibilidade de ocorrência de doenças, gerando perdas econômicas pela incidência de enfermidades no plantel que comprometem o desenvolvimento dos animais, ao seus tratamentos e, em último caso, à mortalidade (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1997).

Para assegurar a qualidade sanitária desses organismos, e da água em que são criados, tornam-se necessários a melhoria nas práticas de manejo. O aumento do conhecimento em patologia e parasitologia de organismos aquáticos e o incremento das técnicas de diagnóstico (SILVA-SOUZA, 2006), com tratamentos especializados (PORTZ, 2006) podem auxiliar no manejo piscícola.

No Brasil, embora não haja dados oficiais demonstrando prejuízos econômicos originados a partir de enfermidades em pisciculturas comerciais, os patógenos são uma realidade e se tornam ameaças concretas à medida que o setor se expande e os sistemas aquícolas se intensificam (LIMA, 2004). Assim, é necessário o desenvolvimento de protocolos de tratamento seguros para os peixes e para o ambiente, com baixa toxicidade e efeito residual no ambiente e na carne, de fácil aplicação para a utilização nas propriedades produtoras.

O uso de um farmoquímico na aquicultura envolve muitos fatores que devem ser avaliados, pois este será utilizado de forma direta no ambiente e os

peixes consumidos poderão apresentar resíduos. A etapa inicial do processo de avaliação da viabilidade de um farmoquímico deve ser a avaliação da toxicidade inerente do ingrediente ativo com espécies representativas de diferentes níveis tróficos. O desenvolvimento da aquicultura depende da tomada de decisão sobre o tipo de farmoquímico a ser empregado e os possíveis riscos para a saúde ambiental e do consumidor. Desta forma, são necessários estudos que possam demonstrar a eficácia de controle, a toxicidade e os possíveis efeitos sobre os organismos de criação.

O teflubenzuron (TFB) $C_{14}H_6Cl_2F_4N_2O_2$ (Figura 1) é um inseticida do grupo benzoilfeniluréia desenvolvido para uso agrícola com ação reguladora do crescimento de artrópodes e crustáceos, mas tem sido incorporado à ração de peixes para o tratamento de infestações dos copépodos.

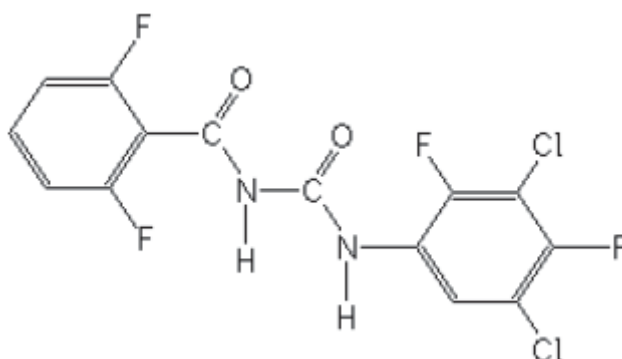


Figura 1. Fórmula estrutural do teflubenzuron.

O TFB administrado *per os* na dose 10 mg/kg/peixe por um período de um a sete dias consecutivos reduziu significativamente o número do copépodo *Lepeophtheirus salmonis* em salmão com redução no número de parasitos em 83,4 e 86,35% (BRANSON *et al.*, 2000).

Toksen (2010) não observou eficácia do TFB contra larvas e adultos do copépodo *Lernanthropus kroyeri*, quando administrado via oral em doses de 10 e 20 mg.kg⁻¹ de biomassa dia⁻¹ durante sete dias consecutivos em salmão.

O TFB pertence ao grupo dos IGRs “Insect Growth Regulators” que são divididos em três categorias dependendo do tipo de ação: análogos ao hormônio juvenil, os que agem como inibidores da síntese e ou deposição de quitina e os derivados do composto orgânico que interfere na muda e pupação.

Sua ação é diferenciada dos demais inseticidas, pois, provoca mudanças morfofisiológicas no processo de desenvolvimento e metamorfose dos insetos, além de agir morfogeneticamente induzindo a completa emergência dos adultos (GRAF, 1993; FOURNET *et al.*, 1995; HOFFMAN & LORENZ, 1998).

O estudo fundamental da fisiologia destes hormônios foi evidenciado na década de 30. Mais tarde Wirgglesworth (1936) estudando os diferentes estágios de *Rhodinus prolixus* descobriu as funções do hormônio juvenil, caracterizando suas principais atividades: controlar a metamorfose e regular a reprodução dos adultos (NORIEGA, 2004).

Em 1956 foi isolado o hormônio juvenil do extrato cru do abdome de machos de mariposa *Hyalophora cecropia* e verificada que sua aplicação tópica impedia a metamorfose e a reprodução dos insetos. Entretanto, somente em 1965 foi estudada a possibilidade de aplicação deste hormônio no desenvolvimento de insetos.

Os peixes e invertebrados aquáticos podem acumular farmoquímicos em concentrações muito maiores do que as da água, pois esses compostos podem se ligar à matéria orgânica que é ingerida por esses animais (NIMMO, 1985).

O pacu, *P. mesopotamicus*, originário da bacia Paraná-Paraguai e por apresentar facilidade na produção de alevinos e esportividade, tem sido muito utilizado nos criatórios nos principais sistemas aquícolas brasileiros. Segundo a estatística de produção publicada pelo IBAMA (2008), referente ao ano de 2007, o pacu destaca-se como a segunda espécie nativa mais criada, perdendo apenas para o tambaqui, *Colossoma macropomum*.

Assim, no Brasil há poucos farmoquímicos registrados para serem utilizados na aquicultura. O desenvolvimento destes é fundamental para aumentar a possibilidade de sucesso no controle dos principais parasitos de peixes que ocorrem no Brasil.

OBJETIVOS

Diante do exposto, os objetivos gerais deste estudo foram:

- Estimar a toxicidade aguda do TFB para os organismos bioindicadores: o microcrustáceo *Daphnia magna*, a macrófita aquática *Lemna minor*, o molusco *Pomacea canaliculata*, e o peixe *Hyphessobrycon eques*, monitorando as variáveis físicas e químicas da água durante os ensaios para as duas últimas espécies.
- Calcular o risco de intoxicação ambiental pelo TFB por meio de ensaios de toxicidade aguda e crônica para *P. mesopotamicus*; avaliar as variáveis físicas e químicas da água durante os ensaios; verificar os efeitos histopatológicos em brânquias, fígado e rins de pacu.
- Ajustar a dose, verificar a eficácia do TFB contra o protozoário *Trichodina* sp. em pacu e tilápia e monitorar as variáveis físicas e químicas da água durante o experimento.
- Avaliar as possíveis alterações hematológicas em pacu expostos ao TFB, além das variáveis físicas e químicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANSON, E.J.; RONSBERG, S.S; RITCHIE, G. Efficacy of teflubenzuron (Calicide®) for the treatment of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1838), infestations of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Research** v. 31, p. 861-867, 2000.

FOURNET, F.; SANNIER, C.; MORINIERE, M.; PORCHERON, P.; MONTENY, N. Effects of two insect growth regulators on ecdysteroid production in *Aedes aegypti*. **Journal Medical Entomology**. v.32, p. 588 -593, 1995.

GRAF, J.F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today** v.9, p.471-474, 1993.

HOFFMANN, K.H.; M.W. LORENZ. Recent advances in hormones in insect pest control. **Phytoparasitica** v.26, p.1-8, 1998.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2007**. Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 151p. 2008.

LIMA, A.C.N. Residualidade da oxitetraciclina no tecido do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (crustacea, decapoda) submetido a tratamento antibiótico. **Dissertação de Mestrado** Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará. 63 p., 2004.

NIMMO, D.R. Pesticides, In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 665 p, 1985.

NORIEGA, F.G. Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v.34, p. 687-693, 2004.

PORTZ, L. Recentes avanços na imuno-nutrição de peixes. In: SILVASOOUZA, A.T. **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**. Ed. Abrapoa. Maringá, PR. p.229-237. 2006.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; CAMPOS, B.E.S.; EIRAS, A.C. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.14, n.2, p.329-339, 1997.

SILVA-SOOUZA, A.T.; ATEM, A.C.G.; MADRUGA, M.N.K. Parasitos de peixes como indicadores da condição do alto curso do ribeirão Cambé. In: SILVA-SOOUZA, A.T. **Diagnóstico das condições biológicas e ambientais do alto ribeirão Cambé. Relatório técnico-científico**. Londrina, PR. p.57-70, 2006.

TOKSEN, E. [The effect of Teflubenzuron on the control of *Lernanthropus kroyeri* \(van Beneden, 1851\) \(Lernanthropidae\) infestations in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* \(Linnaeus, 1758\)](#). **Bulletin Of The European Association Of Fish Pathologists**, v.30, n.6, p.205-210, 2010.

**SEGURANÇA AMBIENTAL DO INSETICIDA TEFLUBENZURON PARA OS
ORGANISMOS NÃO-ALVO *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Pomacea
canaliculata* e *Hyphessobrycon eques***

RESUMO – Os efeitos tóxicos e a segurança ambiental do Teflubenzuron (TFB), inseticida utilizado para o controle de parasitos de peixes, podem ser avaliados em condições de laboratório nos ensaios de toxicidade aguda com organismos teste. Foi avaliada a toxicidade aguda e a segurança ambiental do uso do TFB, com base nos valores de CE50 e CL50 para os organismos não-alvo: *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata* e *Hyphessobrycon eques*. Os testes de ecotoxicidade aguda foram realizados de acordo com normas nacionais e internacionais para estas espécies. A CE50;48h estimada para *D. magna* alcançou 0,17 $\mu\text{g.L}^{-1}$, o que caracteriza este inseticida como altamente tóxico para a espécie. Para *L. minor*, a CE50;7d estimada foi >1000,0 mg.L^{-1} e para *P. reticulata* e *H. eques* a CL50;48h, > 1000,0 mg.L^{-1} para esses organismos, resultados estes que classificam o TFB como praticamente não - tóxico para estas três espécies. O farmoquímico causou aumento da condutividade elétrica e diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água, durante os ensaios para *P. reticulata* e *H. eques*. O TFB não foi seguro para *D. magna* devido a alta toxicidade para o microcrustáceo, embora seguro para os demais organismos não-alvo.

Palavras-chave: organismos aquáticos e intoxicação ambiental.

1. INTRODUÇÃO

Os efluentes da piscicultura podem ser considerados como fontes pontuais de poluição e, dependendo do tipo de cultivo, podem conter compostos químicos que são empregados durante as práticas de manejo. Entre eles, destacam-se os parasiticidas, antibióticos, corantes, anestésicos, desinfetantes, oxidantes, reguladores de pH, algicidas, anti-incrustantes, aditivos plásticos e hormônios (BEVERIDGE *et al.*, 1991).

Os produtos químicos utilizados em sistemas aquícolas são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microorganismos, animais e plantas, o qual se deseja controlar ou eliminar. No entanto, determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, causam efeito não somente no organismo-alvo, como também nos outros seres vivos do ambiente (SPADOTTO *et al.*, 2004).

O teflubenzuron (TFB) é um inseticida desenvolvido para uso agrícola, mas tem sido usado incorporado à ração de peixes para o tratamento de infestações parasitárias. É um produto químico derivado da uréia com ação reguladora do crescimento de artrópodes e crustáceos, interferindo diretamente na biossíntese de quitina. Esse componente é fundamental no exoesqueleto dos artrópodes e crustáceos, que são os principais ectoparasitos de peixes.

De acordo com Martins (2004), um produto químico ideal a ser utilizado na aquicultura deve apresentar ausência de danos aos peixes, ter degradação rápida, não deixar resíduo na água, no substrato ou no tecido do animal, não interferir na qualidade da água, não oferecer perigo aos humanos e animais, baixo custo e fácil aplicação. Contudo, sabe-se que a maioria dos produtos

utilizados para este fim são altamente tóxicos se administrados de maneira incorreta ou indiscriminada.

A dificuldade encontrada para realizar algum tipo de tratamento é o desconhecimento da eficácia dos produtos, além da ausência da comprovação científica de sua toxicidade, segurança ou possíveis efeitos metabólicos e resíduos.

Os ensaios de ecotoxicidade aquática são ferramentas utilizadas para detectar e avaliar os efeitos toxicológicos potenciais de farmoquímicos utilizados em organismos aquáticos. Por meio de bioensaios, organismos aquáticos respondem a presença ou ao efeito de uma substância tóxica, isolada ou combinada com outras. Assim, esses ensaios fornecem uma base de dados que pode ser usada para avaliar o risco associado com a situação no qual o xenobiótico, o organismo e as condições de exposição são definidas (RAND & PETROCELLI, 1985).

Para efeito de monitoramento de um corpo de água possivelmente contaminado com substâncias tóxicas, um dos ensaios mais utilizados é o de avaliação da toxicidade aguda, pois proporciona rápidas respostas na estimativa dos efeitos letais de um agente tóxico sobre os organismos aquáticos (LOMBARDI, 2004).

Várias espécies vêm sendo empregadas internacionalmente em testes de toxicidade, gerando subsídios importantíssimos para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de diversos agentes tóxicos e em corpos receptores. Dentre os principais grupos de organismos, utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se: microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, moluscos, peixes, macrófitas e bactérias,

representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

Para a escolha do organismo-teste geralmente usam-se os seguintes critérios de seleção de espécies: abundância e disponibilidade; significativa representação ecológica dentro das biocenoses; cosmopolitismo da espécie; conhecimento da sua biologia, fisiologia e hábitos alimentares; estabilidade genética e uniformidade de suas populações; baixo índice de sazonalidade; sensibilidade constante e apurada; importância comercial; facilidade de cultivo em laboratório e, se possível, a espécie deve ser nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas (RAND & PETROCELLI, 1985).

Não existe uma única espécie de organismo que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema. Por este motivo, recomenda-se empregar no mínimo três espécies que representem diferentes níveis na cadeia trófica, a fim de se obter resultados mais precisos e detectar um efeito tóxico específico, aumentando a probabilidade de se obter uma resposta tóxica com organismos de diferentes sensibilidades (BAUN *et al.*, 1999).

Assim, os objetivos deste trabalho foram estimar a toxicidade aguda (CE50 e CL50) para avaliar a segurança ambiental do Teflubenzuron para os organismos bioindicadores: o microcrustáceo *Daphnia magna*, a macrófita aquática *Lemna minor*, o molusco *Pomacea canaliculata* e o peixe *Hyphessobrycon eques*, assim como avaliar as variáveis físicas e químicas da água para as duas últimas espécies mencionadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, Nepeam, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, campus de Jaboticabal.

O teflubenzuron (150g de ingrediente ativo) na formulação Nomolt[®] foi fornecido pela BASF S.A. Os organismos utilizados foram cultivados no laboratório e fornecidos por criadores credenciados da região.

2.1 Toxicidade aguda para *Daphnia magna*

Para o ajuste da relação concentração/resposta, um ensaio preliminar foi montado para se estabelecer o intervalo de soluções teste a ser utilizado no ensaio definitivo. Para a realização dos experimentos de toxicidade aguda foram preparadas soluções estoques de teflubenzuron no momento da realização do ensaio. As soluções foram mantidas na temperatura do ensaio no momento da transferência dos organismos. A partir destas soluções foram obtidas as concentrações 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em tubos de ensaio de vidro de 30,0 mL, foram preparados volumes conhecidos de soluções estoques, completando-se 9,0 mL com água natural ajustada. O volume foi completado para 10,0 mL com 1,0 mL de água de cultivo, contendo cinco animais neonatos. Para a avaliação da concentração efetiva CE50;48h foi conduzido um experimento compostos por cinco tratamentos com quatro repetições e controle, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os experimentos foram realizados em sala de bioensaios

durante 48 horas, com temperatura de 18 e 22 °C, em ambiente escuro, sem alimentação.

Após 24 e 48 horas de exposição, os animais imóveis que não foram capazes de nadar durante 15 segundos serão retirados (ABNT, 2011). O valor da concentração efetiva CE_{50;48h} foi estimado pelo método “Trimmed Spearman Karber” (HAMILTON *et al.*, 1977).

2.2 Toxicidade aguda para *Lemna minor*

A aclimação das macrófitas foi realizada em cristalizadores com 1,0 L de meio de cultivo Hoagland's e 1,0 L de água destilada em sala de bioensaio em temperatura de 25 ± 2 °C e iluminação constante com lâmpadas fluorescentes modelo LF-20W/RS com 1000 lux, por três dias.

As plantas foram previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2% e água destilada e foram transferidas quatro colônias com três frondes cada colônia para recipientes com 50,0 mL de Hoagland's. As macrófitas permaneceram em sala de bioensaio por mais 24 horas e em seguida foi adicionado mais 50,0 mL de Hoagland's com a solução teste.

Foram realizados testes periódicos de sensibilidade com cloreto de sódio para avaliação da sanidade dos lotes de plantas (OECD, 2002).

Nos ensaios definitivos foram utilizadas as concentrações: 700,0; 800,0; 900,0 e 1000,0 mg.L⁻¹ e um controle, todos com três réplicas. As avaliações foram realizadas em 3, 5 e 7 dias após a exposição.

2.3 Toxicidade aguda para *Hyphessobrycon eques* e *Pomacea canaliculata*

Os peixes, com peso entre 0,5 e 1,0 gr e caramujos com peso médio de 1,5 gr, foram aclimatados por dez dias em sala de bioensaio a 25 ± 2 °C, pH entre 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido $> 4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e condutividade elétrica entre 170,0 e 180,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (ABNT, 2011).

Inicialmente, para avaliar a sensibilidade do lote dos organismos foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância “referência” cloreto de potássio (KCl, *Pro-analisis*). A CL50 para o mato grosso foi de $2,63 \text{ mg.L}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% entre $2,38 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,90 \text{ mg.L}^{-1}$ e a CE50 para o caramujo foi de $1,97 \text{ mg.L}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% entre $1,59 \text{ mg.L}^{-1}$ e $2,45 \text{ mg.L}^{-1}$. Em seguida, foram realizados os ensaios preliminares com o TFB para determinar os intervalos de concentração em que a substância causa zero e 100% de mortalidade.

A partir desses ensaios foram determinadas as seguintes concentrações: 700,0; 800,0; 900,0 e 1000,0 mg.L^{-1} de TFB e um controle para serem utilizadas nos ensaios definitivos para as duas espécies. Nestes ensaios foram utilizadas concentrações de até 1000,0 mg.L^{-1} , ou seja, dez vezes a recomendada no teste limite, e constata-se que, com pelo menos 99% de confiança, o valor da CL50;48h do TFB é superior à concentração limite de 100,0 mg.L^{-1} (OECD, 2008).

Os dois ensaios foram conduzidos em sistema estático, com três repetições e com densidade máxima de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (ABNT, 2011). Para o ensaio com o mato grosso foram utilizados três peixes por réplica e para o caramujo cinco animais por réplica.

Os sinais de intoxicação para o mato grosso (agitação, posição na coluna d'água, batimento opercular, natação errática e capacidade de arfagem), a avaliação da mobilidade do caramujo e as variáveis físicas e químicas da água (pH, temperatura, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido) foram realizadas em 0, 24 e 48 horas após a exposição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os ensaios de toxicidade aguda não ocorreu mortalidade para *L. minor*, *P. reticulata* e *H. eques*. A CE50;48h estimada para *D. magna* foi 0,17 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (LI = 0,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ LS= 0,20 $\mu\text{g.L}^{-1}$), o que caracteriza este inseticida como altamente tóxico para esta espécie (ZUCKER, 1985). Para *L. minor*, a CL50;7d estimada foi > 1000,0 mg.L^{-1} , e para *P. reticulata* e *H. eques* a CE50;48h e a CL50;48h foi >1000,0 mg.L^{-1} para ambos organismos, que classificam o TFB como praticamente não - tóxico para estas três espécies (ZUCKER, 1985) (Tabela 1).

Tabela 1. Valores da CL50/CE50 do TFB para *Daphnia magna*, *Lemna minor*, *Hyphessobrycon eques* e *Pomacea canaliculata*.

	<i>D. magna</i>	<i>L. minor</i>	<i>H. eques</i>	<i>P. reticulata</i>
Limite Inferior	0,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-
CL50/CE50	0,17 $\mu\text{g.L}^{-1}$	>1000 mg.L^{-1}	>1000 mg.L^{-1}	>1000 mg.L^{-1}
Limite Superior	0,20 $\mu\text{g.L}^{-1}$	-	-	-
Classificação	Extremamente tóxico	Praticamente não-tóxico	Praticamente não-tóxico	Praticamente não-tóxico

A OECD (2008) determina que os testes de toxicidade aguda devem ser realizados com concentrações de até 100,0 mg.L⁻¹, pois a ausência de mortalidade nesta concentração indica que esse organismo não é o grupo mais sensível para a substância em exposição à curto prazo. Neste trabalho foram utilizadas concentrações de até 1000,0 mg.L⁻¹, ou seja, dez vezes a recomendada e constata-se que, com pelo menos 99% de confiança, o valor da CL50;48h do TFB é superior à concentração limite de 100,0 mg.L⁻¹ (OECD, 2008).

Tabela 2. Valores da CL50 para os peixes *P.mesopotamicus*, *P. reticulata*, *C. carpio* e *O. mykiss*.

	<i>P. mesopotamicus</i>	<i>P. reticulata</i>	<i>C. carpio</i>	<i>O. mykiss</i>
CL50	>1000,0 mg.L ⁻¹	2.707,87 mg.L ⁻¹	>500 mg.L ⁻¹	>500 mg.L ⁻¹
Tempo de exposição (h)	48	96	96	96
Classificação	Praticamente. não-tóxico	Praticamente não-tóxico	Praticamente não-tóxico	Praticamente não-tóxico
Autor	Winkaler, 2008	Medeiros, 2008	USEPA, 1999	USEPA, 1999

Para o mato grosso, a baixa toxicidade foi semelhante ao descrito para o pacu (*P. mesopotamicus*) (WINKALER, 2008), guaru (*Poecilia reticulata*) (MEDEIROS, 2008), *Cyprinus carpio* e *Oncorhynchus mykiss* (USEPA, 1999). O TFB manteve a mesma classificação de toxicidade tanto para peixes neotropicais quanto para peixes de clima temperado, independente do tempo de exposição do ensaio de toxicidade aguda.

A baixa toxicidade para a macrófita aquática *Lemna minor* (CL50;7d = > 1000,0 mg.L⁻¹) foi semelhante a obtida por Medeiros (2008) para o TFB (CL50;7d = 1.176,2 mg.L⁻¹).

Ao contrário da baixa toxicidade do TFB para o *P. canaliculata* (CE50;48h = > 1000,0 mg.L⁻¹) observou-se alta toxicidade do TFB para o microcrustáceo *Daphnia magna* (CE50;48h = 0,17 µg.L⁻¹), corroborando os achados por Medeiros (2008) (CE50;48h = 0,26 µg.L⁻¹) e pela Security Enviromental Protection Agency, SEPA (1999) (CE50;48h = 0,28 µg.L⁻¹). Essa alta toxicidade ocorre devido à interferência do farmoquímico na biossíntese de quitina do microcrustáceo em questão (MEDEIROS, 2008).

O TFB causou o aumento da condutividade elétrica na água e diminuição da concentração de oxigênio dissolvido da água durante os ensaios de toxicidade da *P. canaliculata* e *H. eques* embora não significativo. Durante o processo de degradação do TFB na água pode ocorrer a liberação de íons de flúor e de cloro, causando aumento da condutividade elétrica da água. O consumo de oxigênio pelos peixes e a degradação do farmoquímico diminuiu a concentração de oxigênio dissolvido da água, fazendo com que os peixes buscassem oxigênio na interface água - ar (Tabelas 3 e 4).

As demais variáveis físicas e químicas da água, como temperatura e pH restantes não se alteraram e permaneceram de acordo com as normas da ABNT (2011). A redução do oxigênio dissolvido fez com que os peixes permanecessem na superfície em busca oxigênio na interface água - ar.

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas da água durante o teste de toxicidade aguda do teflubenzuron para o peixe mato grosso *H. eques*.

Variáveis	Temperatura (°C)			Condutividade Elétrica (µS.cm ⁻¹)		
Concentração (mg.L ⁻¹)	0h	24h	48h	0h	24h	48h
0,0	25,5	26,0	26,1	0,184	0,189	0,193
700,0	25,5	26,0	26,1	0,234	0,238	0,238
800,0	25,4	25,9	25,8	0,243	0,247	0,247
900,0	25,5	26,0	25,8	0,250	0,255	0,255
1000,0	25,4	25,8	25,7	0,259	0,264	0,264
Variáveis	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)			pH		
Concentração (mg.L ⁻¹)	0h	24h	48h	0h	24h	48h
0,0	7,7	7,3	7,2	7,9	7,9	7,9
700,0	7,9	6,6	2,9	7,7	7,7	7,7
800,0	7,8	3,4	2,4	7,8	7,7	7,7
900,0	7,7	2,6	2,3	7,8	7,8	7,7
1000,0	7,7	2,5	2,3	7,8	7,8	7,7

Tabela 4. Variáveis físicas e químicas da água durante o teste de toxicidade aguda do teflubenzuron para o caramujo *P. canaliculata*.

Variáveis	Temperatura (°C)			Condutividade Elétrica (µS.cm ⁻¹)		
Concentração (mg.L ⁻¹)	0h	24h	48h	0h	24h	48h
0,0	25,9	26,2	25,9	0,166	0,170	0,171
700,0	25,9	26,5	26,2	0,170	0,199	0,225
800,0	26,0	26,7	26,4	0,179	0,199	0,230
900,0	26,1	26,7	26,4	0,184	0,230	0,242
1000,0	26,0	26,7	26,1	0,199	0,235	0,244
Variáveis	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)			pH		
Concentração (mg.L ⁻¹)	0h	24h	48h	0h	24h	48h
0,0	4,5	2,9	3,4	7,3	7,2	6,9
700,0	1,4	0,6	0,9	7,2	7,3	6,9
800,0	1,3	0,6	0,7	7,3	7,3	7,0
900,0	1,3	0,5	0,6	7,0	7,3	7,0
1000,0	1,0	0,3	0,6	7,1	7,3	7,1

4. CONCLUSÃO

O teflubenzuron é considerado seguro desde que utilizado de forma controlada e em quantidades restritas de água.

Com a segurança ambiental estimada, foi cumprida parte da etapa de avaliação ecotoxicológica do TFB. Essa etapa é a inicial do processo de viabilização de um farmoquímico para registro na aquicultura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda**. São Paulo, 19 p, 2011.

BAUN, A.; KLOEFT, L.; BJERG, P.L. & NYHOLM, N. Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with land fill leached. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, n.9, p.2046-2053, 1999.

BEVERIDGE, M.C.M.; PHILLIPS, M.J.; CLARKE, R.M. A quantitative and qualitative assessment of wastes from aquatic animal production. In: BRUNE D.E.; TOMASSO J.R. (eds.) Aquaculture and water quality, advances in world aquaculture. **The World Aquaculture Society**, v.3, p.506-533, 1991.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977.

LOMBARDI, J.L. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela. São Paulo – SP, p. 263-272, 2004.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S.A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. ***Oecologia Brasiliensis***. v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MARTINS, M.L. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na Aqüicultura Brasileira. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela. São Paulo – SP, p. 357-370, 2004.

MEDEIROS, L.S. Toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida teflubenzuron para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*. **Dissertação de Mestrado** Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, 66f., 2008.

OECD, **Guideline for testing of chemicals draft revised guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test**, 5p, 2008.

OECD, **Guideline for testing of chemicals: *Lemna* sp. Growth inhibition test**. Organization for economic cooperation and development. 22p, 2002.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington, 665 p, 1985.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A. F.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 29 p, 2004.

U.S. EPA. *Reregistration Eligibility Document: diflubenzuron*. Office of Pesticide Programs. Washington, DC. In. www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0144fact.pdf. 1999. Acesso em 04/07/2011.

WINKALER, E.U. Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Tese de Doutorado** Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, 79f., 2008.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure. **Acute toxicity test for freshwater fish.** (USEPA Publication 540/9-85-006). 1985.

ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS E HISTOPATOLOGIA DO INSETICIDA TEFLUBENZURON EM PACU, *Piaractus mesopotamicus*

Resumo – As doenças causadas por parasitos são um dos principais fatores limitantes da produtividade aquícola. Os farmoquímicos com potencial para serem utilizados no tratamento de doenças parasitárias necessitam de estudos ecotoxicológicos, de segurança e de eficácia no controle. Assim, os objetivos deste trabalho foram estimar a toxicidade aguda (CL50;48h) e crônica do inseticida teflubenzuron (TFB) para o *Piaractus mesopotamicus*, avaliar as variáveis físicas e químicas da água durante os dois ensaios, determinar o risco de intoxicação ambiental deste farmoquímico para esta espécie e avaliar os efeitos histopatológicos nas brânquias, fígado e rins após exposição crônica a este inseticida. O TFB não causou mortalidade dos peixes nos ensaios agudo e crônico, portanto, a CL50;48h > 1000,0 mg.L⁻¹ classificado como praticamente não-tóxico e sem causar risco de intoxicação ambiental para o pacu. A concentração de efeito não-observado (CENO) foi > 20,0 mg.L⁻¹ pois não ocorreu mortalidade, e a concentração de efeito observado (CEO) não ocorreu durante o ensaio de toxicidade crônico. As alterações histopatológicas causadas pelo TFB são consideradas reversíveis.

Palavras-chave: Ecotoxicidade, farmoquímico, aquicultura.

1. INTRODUÇÃO

A intensificação dos sistemas de produção aquícola aliada a fatores como manejo inadequado e alta densidade de estocagem, podem ocasionar o aparecimento de doenças, que causam grandes perdas econômicas. (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1997; SCHALCH & MORAES, 2005).

Os microrganismos vivem em equilíbrio no ambiente, no corpo e nas vísceras dos peixes. Porém, qualquer fator que tenha efeito direto na saúde do peixe e diminua sua resistência imunológica contribui para que os agentes patogênicos se proliferem, podendo levar o hospedeiro à morte (MORAES & MARTINS, 2004).

As perdas causadas por parasitos representam fator determinante para o sucesso da piscicultura, pois, além de disseminar agentes patogênicos para o ambiente, representam riscos à saúde pública (MARTINS *et al.*, 2002). Protozoários como *Trichodina* sp. e *Ichthyophthirius multifiliis* e os Monogenoidea, *Dactylogyrus* e *Gyrodactylus*, destacam-se como sendo os ectoparasitos de maior importância para os peixes (MARTINS, 1998; MARTINS *et al.*, 2002).

O teflubenzuron (TFB) é um inseticida derivado da uréia com ação reguladora do crescimento de artrópodes e crustáceos. Ao ser administrado por via oral, entra na corrente sanguínea do peixe e o parasitos durante a hematofagia ingerirem o inseticida. Este inseticida pode ser usado na aquicultura para o controle de parasitos de peixes, pois é pouco tóxico para a maioria dos vertebrados (MEDEIROS, 2008; WINKALER, 2008) e tem demonstrado eficácia contra as infestações do copépodo, piolho de salmão, *Lepeophtheirus salmonis* incorporado à ração (10,0 mg.kg⁻¹ de peixe) por sete dias (BRANSON *et al.*, 2000).

Os possíveis efeitos tóxicos e o risco ambiental dos xenobióticos podem ser avaliados em condições de laboratório em ensaios de toxicidade com organismos teste não alvos, sendo determinados o tempo e as concentrações em que o agente químico é potencialmente prejudicial (ZAGATTO & BERTOLETI, 2008).

Em ambientes aquáticos degradados os farmoquímicos normalmente ocorrem em concentrações subletais, de maneira que alterações na estrutura e na fisiologia dos organismos aquáticos são mais comuns que a mortalidade em massa (POLEKSIC & MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Estas alterações, uma vez caracterizadas, podem ser utilizadas como biomarcadores (JOBILING, 1995), que consistem em alterações biológicas relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de um contaminante ambiental (PEAKALL, 1994).

Uma resposta fisiológica é uma alteração causada por um agente estressor, e pode ser iniciada no organismo para a manutenção da homeostase, ou a alteração pode refletir um colapso de alguma função fisiológica gerado diretamente pelo estressor, e nesse caso ser considerada mais como um efeito que uma resposta. Assim, um efeito fisiológico pode iniciar uma resposta fisiológica para corrigir o estado interno alterado do animal (HEATH, 1995), e ambos (o efeito e a resposta) podem ser usados como biomarcadores.

No Brasil, nos últimos anos, tem crescido o nível de procura pela criação de peixes em cativeiro, como o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, um peixe nativo de hábito alimentar onívoro, com rápido crescimento e boa qualidade de

carne (JOMORI *et al.*, 2003), sendo a segunda espécie nativa mais cultivada (IBAMA, 2008).

Assim, os objetivos deste trabalho foram estimar a toxicidade aguda (CL₅₀;48h) do TFB, na formulação Nomolt[®], avaliar a toxicidade crônica deste inseticida, determinar o risco de intoxicação ambiental e os efeitos histopatológicas em brânquias, fígado e rins do pacu após a exposição crônica ao TFB para o pacu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, Nepeam, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, campus de Jaboticabal.

O teflubenzuron (150g de ingrediente ativo) na formulação Nomolt[®] foi fornecido pela BASF S.A. Os peixes foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da Unesp e por criadores credenciados da região.

2.1 Ensaios de toxicidade aguda

Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda foram utilizados exemplares de alevinos de pacu com peso entre 0,5 e 1,0 gr. Estes animais foram mantidos em quarentena no setor de criação de organismos aquáticos do próprio laboratório por aproximadamente 30 dias.

Após este período, os animais considerados sadios e livres de doenças foram aclimatados por dez dias em sala de bioensaio, a 25 ± 2 °C, em tanques com capacidade de 250 L de água. Os animais foram alimentados com ração comercial com teor de 32% de proteína, uma vez ao dia, à vontade. O pH foi

mantido entre 7,0 e 8,0, oxigênio dissolvido $> 4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e condutividade elétrica entre $170,0$ e $180,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (ABNT, 2011).

Inicialmente, para avaliar a sensibilidade dos peixes foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância referência cloreto de potássio (KCl, *Pro-analysis*) com CL50;48h de $1,54 \text{ g.L}^{-1}$, com intervalo de confiança de 95% entre $1,28$ a $1,86 \text{ g.L}^{-1}$.

Em seguida, foram realizados os ensaios preliminares para determinar o intervalo de concentração em que a substância causa zero e 100% de mortalidade.

A partir desses ensaios preliminares foram determinadas as seguintes concentrações: $700,0$; $800,0$; $900,0$ e $1000,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TFB e um controle para realização dos ensaios definitivos. Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, de três réplicas com três peixes em cada na densidade máxima de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (ABNT, 2011).

A mortalidade, os sinais de intoxicação (agitação, posição na coluna d'água, batimento opercular, natação errática e capacidade de arfagem) de acordo com Murthy *et al.* (1984) e as variáveis físicas e químicas da água (pH, temperatura, condutividade elétrica e oxigênio dissolvido) foram avaliados em 0, 24 e 48 horas após a exposição.

A CL50;48h foi calculada com os dados acumulados de mortalidade em 48 horas de exposição, pelo software Trimmed Spearman Karber e o farmoquímico foi classificado de acordo com Zucker (1985).

2.2 Ensaios de toxicidade crônica e análise histopatológica

Os peixes foram aclimatados em sala de bioensaio por dez dias a 25 ± 2 °C em tanques de 250 L, com água da rede de abastecimento. A água era sifonada uma vez ao dia para facilitar a retirada de matéria em decomposição. Os peixes foram alimentados com ração comercial com 40% de proteína, uma vez ao dia, a vontade com pH entre 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido $> 4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e condutividade elétrica entre 170,0 e 180,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (ABNT, 2011).

As concentrações utilizadas no ensaio crônico foram baseadas na CL(I)50;48h de $> 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$, obtida no ensaio de toxicidade aguda do TFB para o pacu. A OECD (2008) recomenda que um teste de toxicidade aguda seja realizado de acordo com o limite de concentração (concentração da substância deve ser de $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no teste limite). A ausência de mortalidade durante os ensaios garante 99% de confiança de que a CL50 é maior que o limiar de concentração. Para maior confiabilidade e confirmação da baixa toxicidade do TFB os referidos ensaios de toxicidade aguda foram conduzidos até $1000,0 \text{ mg.L}^{-1}$ conforme descrito no item 2.1.

A determinação das concentrações teste para o ensaio crônico foi baseada no teste limite ($100,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Assim, foram testados os seguintes quocientes: controle, CL50/5, CL50/10, CL50/50 e CL50/100 (ABNT, 2007) referente a 0,0; 1,0; 2,0; 10,0 e 20,0 mg.L^{-1} (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de quociente e concentração utilizados no ensaio de toxicidade crônica do TFB para o pacu, *P. mesopotamicus*

Quociente	Concentração (mg.L ⁻¹)
CL50/100	1,0
CL50/50	2,0
CL50/10	10,0
CL50/5	20,0

Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, com oxigenação artificial, com alimentação a cada dois dias, com três peixes por réplica e duração de sete dias. As avaliações de mortalidade e das variáveis físicas e químicas da água (pH, temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹) e condutividade elétrica (μS.cm⁻¹) foram realizadas em 1, 3, 5 e 7 dias após a exposição ao inseticida.

As variáveis CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) foram calculadas de acordo com as recomendações do IBAMA (1987) e a ocorrência de mortalidade durante o período experimental (7 dias) foi utilizada como variável de estudo.

Ao final do período experimental foi realizada a coleta de amostras para posterior análise histopatológica. Para tanto, três animais de cada tratamento foram eutanasiados por descerebração, sem a utilização de anestésicos para não interferir nos resultados histopatológicos das amostras. Os fragmentos de tecidos de brânquias, fígado e rins foram coletados e imersos em solução fixadora de formaldeído tamponado a 10%, por 24 horas. Após a fixação, os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em Histosec[®] (Merck). A seguir, foi seccionado em micrótomo automático (Leica,

RM-2155) obtendo-se cortes 5 µm de espessura, corados posteriormente com hematoxilina-eosina (HE) (BEHMER *et al.*, 1976). A rotina foi realizada no Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

2.3 Risco de intoxicação ambiental

O risco de intoxicação ambiental é definido como a probabilidade de um farmoquímico, ao cair no ambiente, causar intoxicação em uma determinada espécie. O risco de intoxicação ambiental do TFB para o pacu foi calculado utilizando a razão entre a concentração ambiental estimada (CAE) ou *predicted environmental concentration* (PEC) e a concentração de efeito não observado (CENO) ou *Predicted No-Effect-Concentration* (PNEC), obtida nos ensaios crônicos. Assim, se essa relação for > 1 , causa risco ambiental, se for < 1 , isenta-se (CEC, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaios de toxicidade aguda e crônica.

O teflubenzuron foi considerado praticamente não tóxico para o pacu pela classificação de Zucker (1985), pois a CL50 foi $> 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$. A OECD (2008) determina que os testes de toxicidade aguda devem ser realizados com concentrações de até $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$, pois a ausência de mortalidade nesta concentração indica que esse organismo não é o grupo mais sensível para a substância em exposição à curto prazo. No presente estudo, foram utilizadas concentrações teste de até $1000,0 \text{ mg.L}^{-1}$, ou seja, dez vezes a recomendada e

constata-se que, com pelo menos 99% de confiança, o valor da CL50;48h do TFB é superior à concentração limite de 100,0 mg.L⁻¹ (OECD, 2008).

Tabela 2. Valores da CL50 do TFB para as espécies de peixes *P.mesopotamicus*, *P. reticulata*, *C. carpio* e *O. mykiss*

	<i>P. mesopotamicus</i>	<i>P. reticulata</i>	<i>C. carpio</i>	<i>O. mykiss</i>
CL50	>1000,0 mg.L ⁻¹	2.707,87 mg.L ⁻¹	>500 mg.L ⁻¹	>500 mg.L ⁻¹
Tempo de exposição (h)	48	96	96	96
Classificação	Praticamente não-tóxico	Praticamente não-tóxico	Praticamente não-tóxico	Praticamente não-tóxico
Autor	WINKALER, 2008	MEDEIROS, 2008	SEPA, 1999	SEPA, 1999

A baixa toxicidade foi a mesma encontrada para os peixes: *P. mesopotamicus* (WINKALER, 2008), *Poecilia reticulata* (MEDEIROS, 2008), *Cyprinus carpio* e *Oncorhynchus mykiss* (SEPA, 1999) (Tabela 2). O TFB manteve a mesma classificação de toxicidade tanto para peixes neotropicais quanto para peixes de clima temperado, pois todos apresentaram CL50 acima de 100,0 mg.L⁻¹, independente do tempo de duração dos ensaios.

A baixa toxicidade foi similar a observada para o diflubenzuron (DFB), um inseticida do mesmo grupo do TFB, para os peixes: *Lepomis macrochirus* (CL50;96h = 100,0 mg.L⁻¹), *Cyprinus carpio* (CL50;96h = 393,0 mg.L⁻¹) (USEPA, 1999), *P. mesopotamicus* (CL50;96h = 1200,0 mg.L⁻¹) (LOPES, 2005), *Rhamdia quelen* (CL50;96h = 1000,0 mg.L⁻¹) (KREUTZS *et al.*, 2008), *Zungaro zungaro* (CL50;96h = 500,0 mg.L⁻¹) (PELLI *et al.*, 2008).

Comparados aos outros grupos de inseticidas utilizados no controle de ectoparasitos de peixes, como o triclorfon, o paration metílico e o toltrazuril, o TFB é menos tóxico. LOPES (2005) avaliou a toxicidade aguda do triclorfon para o pacu, *P. mesopotamicus* e estimou a CL₅₀;96h de 0,23 mg.L⁻¹. A CL₅₀;96h estimada do paration metílico para exemplares jovens de pacu foi de 9,89 mg.L⁻¹ e para alevinos, de 3,97 mg.L⁻¹ (CRUZ *et al.*, 2004). O TFB se mostrou menos tóxico do que o toltrazuril (TOL), um farmoquímico derivado de triazina também utilizado para o controle de parasitos de peixes. Este apresentou uma toxicidade moderada, sendo a CL₅₀;96h para truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* de 0,44 mg.L⁻¹ e para *Daphnia magna*, a CE₅₀;48h > 2,0 mg.L⁻¹ (BAYER, 2010).

Neste trabalho, com o aumento da concentração dos inseticidas na água observou-se diminuição da concentração de oxigênio dissolvido e aumento da condutividade elétrica (Tabela 3), chegando a valores inferiores ao recomendado pela Environmental Protection Agency (EPA). Mesmo em altas concentrações testadas, não foi observada mortalidade dos animais expostos aos inseticidas.

A concentração de oxigênio dissolvido na água dos testes para determinação da toxicidade aguda é fator limitante durante a realização dos experimentos ecotoxicológicos para peixes. O limite mínimo de oxigênio dissolvido na água dos testes não deve ser inferior a 4,0 mg.L⁻¹ (USEPA, 1999).

A sobrevivência do pacu em baixas concentrações de oxigênio durante os testes de toxicidade aguda pode ser atribuída ao fato de ser uma espécie do Pantanal Sul Americano. Por esta razão, suporta diversas concentrações de

aeração que se alteram em pulsos de inundação, superando valores menores que 1,0 mg.L⁻¹ (BASTOS *et al.*, 2007).

As variáveis restantes (condutividade elétrica, pH e temperatura) não sofreram alteração e permaneceram de acordo com a ABNT (2011).

Tabela 3. Variáveis físicas e químicas da água durante o teste de toxicidade aguda do Teflubenzuron para o pacu, *P. mesopotamicus*.

Variáveis	Temperatura (°C)			Condutividade Elétrica (µS.cm ⁻¹)		
Concentração (mg.L ⁻¹)	0h	24h	48h	0h	24h	48h
0,0	24,7	25,7	26,1	0,184	0,196	0,206
700,0	24,9	25,8	25,9	0,232	0,244	0,243
800,0	24,8	25,9	25,9	0,239	0,251	0,246
900,0	24,6	25,6	26,0	0,247	0,260	0,257
1000,0	24,6	25,9	25,9	0,254	0,267	0,264
Variáveis	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)			pH		
Concentração (mg.L ⁻¹)	0h	24h	48h	0h	24h	48h
0,0	4,9	2,3	2,6	6,8	7,5	7,6
700,0	4,8	0,9	1,3	7,0	7,6	7,6
800,0	4,5	0,9	1,1	7,0	7,6	7,7
900,0	4,7	0,7	1,0	7,0	7,7	7,7
1000,0	3,6	0,7	0,7	6,9	7,6	7,7

Durante o período experimental, foi observado, conjuntamente aumento do batimento opercular e agitação dos peixes imediatamente após a aplicação (0h), prolapso labial e a permanência dos peixes na superfície dos aquários nas 24 e 48 horas seguintes, caracterizando como indicativo de baixo nível de oxigênio dissolvido na água. Esses sinais de intoxicação também foram observados para a mesma espécie em ensaios agudos com o TFB (WINKALER, 2008).

A degradação do TFB na água fez com que ocorresse a liberação de íons de flúor e de cloro, fazendo com que a condutividade elétrica aumentasse

durante o ensaio de toxicidade aguda. O consumo de oxigênio pelos peixes e a degradação do farmoquímico diminuiu a concentração de oxigênio dissolvido da água, induzindo comportamento diferenciado nos peixes, como captação de oxigênio na superfície da água. Mesmo assim, durante o ensaio crônico, o TFB também não causou mortalidade dos animais expostos. Na avaliação das variáveis físicas e químicas da água, ocorreu aumento da condutividade elétrica em todas as concentrações, inclusive no controle, variando de 0,190 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ no primeiro dia para 0,283 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ no sétimo dia. O excedente de ração não ingerida pelos peixes acrescentado as excretas produzidas podem ter sido responsáveis por essa alteração (BARRETO *et al.*, 2010) (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis físicas e químicas da água durante os dias de avaliação do ensaio de toxicidade crônica do teflubenzuron para o pacu, *P. mesopotamicus*.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Temperatura (°C)				Condutividade Elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)			
	1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d
0,0	25,9	26,3	26,2	26,2	0,190	0,212	0,235	0,275
1,0	25,9	26,0	26,2	26,3	0,187	0,204	0,221	0,297
2,0	26,4	26,4	26,7	26,3	0,190	0,209	0,223	0,347
10,0	26,4	26,4	26,5	26,4	0,193	0,213	0,234	0,254
20,0	26,3	26,4	26,5	26,3	0,190	0,204	0,220	0,246
Concentração (mg.L ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)				pH			
	1d	3d	5d	7d	1d	3d	5d	7d
0,0	9,6	9,9	8,1	7,5	7,7	8,2	8,2	7,4
1,0	9,1	9,6	7,9	8,8	7,6	8,1	8,1	7,8
2,0	8,9	8,6	7,6	7,3	7,6	8,0	8,1	7,8
10,0	5,8	7,8	7,4	7,5	7,5	8,0	8,0	7,8
20,0	8,8	6,1	7,2	8,5	7,6	7,9	8,0	7,9

O valor da concentração de efeito não-observado (CENO) foi maior que 20,0 mg.L⁻¹, pois não ocorreu mortalidade na maior concentração e o valor da concentração de efeito observado (CEO) não ocorreu, pois não foram

verificados efeitos durante os sete dias de exposição. Com esses resultados ($CENO > 20,0 \text{ mg.L}^{-1}$), acrescidos aos dados da concentração ambiental estimada, de $10,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ (BRANSON *et al.*, 2000), o risco calculado foi > 1 . Avaliando os parâmetros o TFB não causa risco de intoxicação ambiental para o pacu conforme a CEC (2003), além de não representar efeito crônico para o peixe, sendo que a CENO indica efeito não tóxico.

3.2. Análise histopatológica

Existem quatro rotas por meio das quais os xenobióticos podem entrar no peixe: pelas brânquias, pela alimentação, ao ingerir água (animais marinhos) e pela pele (HEATH, 1995). Os xenobióticos atuam em diferentes níveis de organização biológica, o que pode levar a diferentes respostas (JOBLING, 1995).

Os farmoquímicos exercem seus efeitos primeiro no nível enzimático, ou alterando alguma função celular, como a permeabilidade das membranas. Estas alterações podem afetar a integridade celular, a ultraestrutura e funções, como consumo de energia ou o nível de secreção hormonal (HEATH, 1995). Se estas alterações são muito severas, pode ocorrer morte celular, resultando em lesões histológicas irreversíveis. Como os órgãos são constituídos de vários tipos celulares, efeitos em um ou mais desses tipos podem comprometer a função do órgão. Por exemplo, alguns farmoquímicos podem causar um descolamento ou uma necrose no epitélio branquial que pode alterar a permeabilidade branquial ao oxigênio e assim comprometer a função respiratória em todo o animal, levando a uma falência da homeostase. Alguns órgãos então começam a apresentar respostas compensatórias (por exemplo,

um aumento na taxa respiratória), na tentativa de restabelecer o equilíbrio interno do organismo. Nesse caso, a alteração inicial na brânquia é um efeito patológico que causa uma ou mais respostas fisiológicas (HEATH, 1995).

3.2.1 Brânquias

A constituição das brânquias dos pacus do grupo controle foi típica de peixes teleósteos, composta pela lamela primária, que é constituída por cartilagem que reveste e a sustenta, no seu interior ocorre a presença de um vaso sanguíneo a partir da lamela secundária. Esta é composta por células mucosas e células de sustentação. Entre as lamelas secundárias ocorre a formação do espaço interlamelar composto por células mucosas, células de revestimento e células cloreto.

Nos animais tratados com CL50/100 ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e CL50/50 ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), as características histopatológicas foram similares ao descrito no controle, não ocorrendo nenhuma alteração na histoarquitetura das brânquias (Figura 3 A).

Nos animais tratados com CL50/10 ($10,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e CL50/5 ($20,0 \text{ mg.L}^{-1}$), as características histopatológicas foram similares ao descrito no controle, porém ocorrendo estase no interior da lamela secundária (Figura 3B). A estase observada ocorreu possivelmente para aumentar a oxigenação sanguínea. Essa alteração também foi observada por Avilez (2008) em matrinxã (*Brycon amazonicus*) expostos ao fenol.



Figura 1. Fotomicrografia de cortes transversais de brânquias de pacu. **A.** Controle. LP: Lamela primária, Setas: Lamelas secundárias. **B.** CL50/10. Estrela: estase. Aumento de 40X. Coloração HE. Barra de 1,0 cm = 34,5 μ m.

3.2.2. Fígado

Histologicamente, o fígado dos peixes no grupo controle apresentou organização cordonal dos hepatócitos formado a partir das veias centrais do órgão (Figura 1A). Os hepatócitos apresentaram citoplasma claro (acidófilo) e núcleo (basófilo) levemente deslocado para a periferia da célula (Figura 1A).

Nos peixes tratados com CL50/5 ($20,0 \text{ mg.L}^{-1}$), as características histológicas foram similares às descritas para os peixes do grupo controle, porém em algumas regiões, ocorreu aumento do volume celular (hipertrofia) e deslocamento do núcleo celular para a periferia. (Figura 1B). Estas alterações podem ser decorrentes do aumento no número de organelas responsáveis por metabolizar o xenobiótico (CARRASCHI, 2010).

Nos peixes tratados com CL50/10 ($10,0 \text{ mg.L}^{-1}$), as características histológicas foram similares ao descrito no tratamento anterior, ocorrendo aumento do diâmetro do capilar sinusóide (Figura 1C), indicativo de maior fluxo sanguíneo no fígado, sugerindo uma estratégia de eliminação dos resíduos produzidos por este órgão para posterior excreção renal ou branquial (VENTURINI, 2010).

Nos animais tratados com CL50/50 ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e CL50/100 ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), a histoarquitetura do tecido hepático foi semelhante ao descrito para o controle.

A estrutura do fígado de pacu (controle, CL50/50 e CL50/100) foram similares as descritas para o pacu (CARRASCHI, 2010 e VENTURINI, 2010).

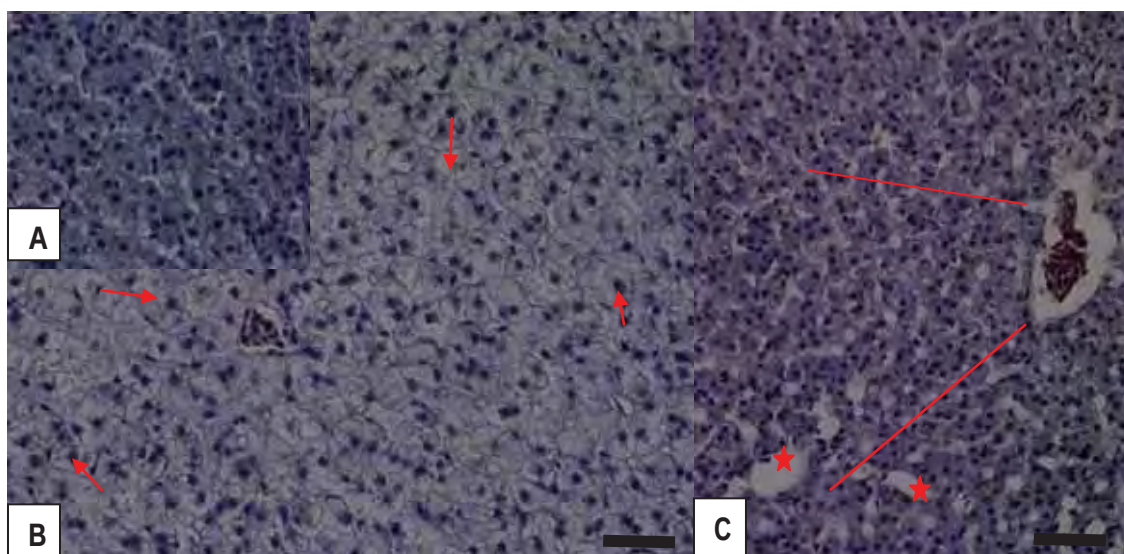


Figura 2. Fotomicrografia de cortes transversais de fígado de pacu, *P. mesopotamicus* expostos ao TFB. **A.** Detalhe do controle. **B.** CL50/5. Seta: hipertrofia e núcleo deslocado para a periferia. **C.** CL50/10. Linha: Arranjo cordonal dos hepatócitos. Estrela: aumento do diâmetro dos capilares sinusóides. Aumento de 40X. Coloração HE. Barra de 1,0 cm = 34,5 μ m.

3.2.2. Rins

Os rins nos animais do grupo controle apresentam glomérulos e túbulos proximais e distais (Figura 2A). No interstício de tecido composto por tecido conjuntivo frouxo, onde ocorre a presença do tecido hematopoiético.

O glomérulo (Figura 2A) constituído por uma cápsula de tecido conjuntivo e no seu interior a presença de anastomose dos capilares aferentes e eferentes. Os túbulos proximais são irregulares e compostos por epitélio de revestimento cúbico simples ciliado. O citoplasma das células epiteliais é claro, situando-se o núcleo localizado na porção mediana da célula.

Os túbulos distais são regulares com formato arredondado, células similares ao descrito nos túbulos proximais.

Nos animais do tratamento CL50/5 ($20,0 \text{ mg.L}^{-1}$), CL50/10 ($10,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e CL50/50 ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), as características histopatológicas foram similares ao descrito no controle, porém os glomérulos se desprenderam da cápsula glomerular (Figura 2B).

Nos animais do tratamento CL50/100 ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) não ocorreu nenhuma alteração na histoarquitetura do tecido renal.

A composição celular normal dos rins de pacu está de acordo com a observada por Cruz (2005) e Carraschi (2010) para o pacu, e por Grizzle & Rogers (1985) para bagre do canal (*I. punctatus*).

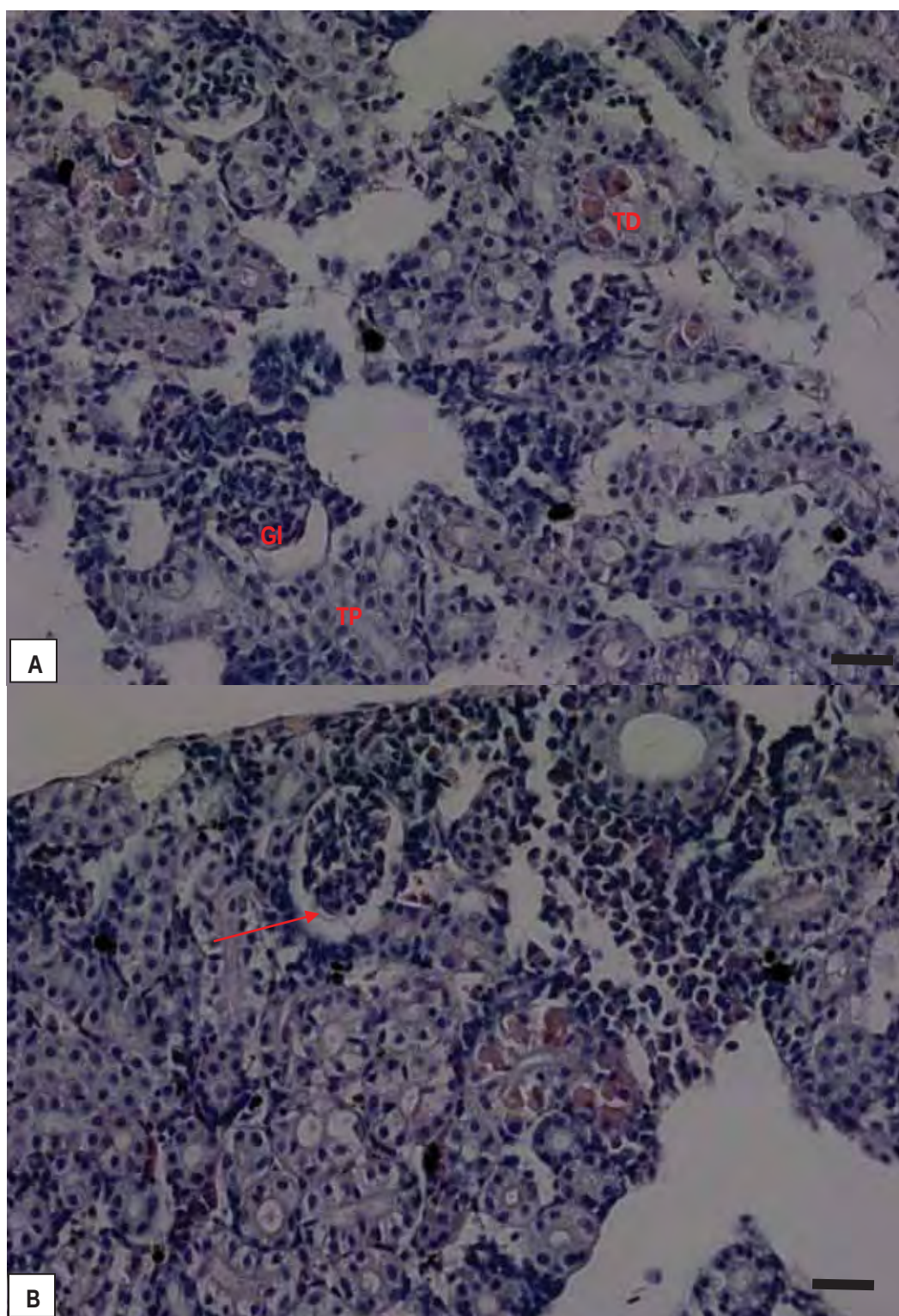


Figura 2. Fotomicrografia de cortes transversais de rins de pacu. **A.** controle TD: túbulo distal; TP: túbulo proximal; Gl: glomérulo. **B.** CL50/5. Seta: glomérulos se desprendendo da cápsula glomerular. Aumento de 40X. Coloração HE. Barra de 1,0 cm = 34,5 μ m.

4. CONCLUSÃO

A partir das análises dos resultados pode-se inferir que:

O Teflubenzuron é praticamente não-tóxico em ensaios agudos, não causando risco de intoxicação ambiental para o pacu, embora cause alterações das variáveis físicas e químicas da água. Nos ensaios crônicos, mesmo não ocorrendo mortalidade, o TFB causa efeito crônico, pois ocorreu alterações tóxicas transitórias em brânquias, fígado e rins de pacu.

Com a segurança ambiental e o risco de intoxicação ambiental do TFB estimados, foi cumprida a etapa inicial do processo de viabilização de um farmoquímico, a avaliação ecotoxicológica, deixando em expectativa o início das próximas etapas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15499. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração- Método de ensaio com peixes.** 21 p. 2007.

AVILEZ, I.M. Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de Matrinxã (*Brycon amazonicus*, SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE) exposto ao fenol. **Tese de Doutorado** Universidade Federal de São Carlos, 90f., 2008.

BARRETO, L.E.G.S., IGARASHI, M.A., HAYASHI, C. Nictemeral Variations for Pacu Caranha, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) Culture in Single – Phase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53, n.4, p.873-881, 2010.

BASTOS, V.L.F.C.; SALLES J.B.; VALENTE R.H.; LEÓN I.R.; PERALES J.; DANTAS R.F.; ALBANO R.M.; BASTOS F.F.; BASTOS J.C. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. **Biochimie** v. 89, p. 1332- 1342, 2007.

BAYER HEALTHCARE. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ). **Baycox oral**, p. 5, 2010.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FERITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**, 239p, 1976.

BRANSON, E.J.; RONSBERG, S.S; RITCHIE, G. Efficacy of teflubenzuron (Calicide®) for the treatment of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1838), infestations of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Research** v. 31, p. 861-867, 2000.

CARRASCHI, S.P. Ecotoxicidade e eficácia da Oxitetraciclina e do Florfenicol contra infecção experimental por *Aeromonas hydrophila* e aspectos histopatológicos em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Dissertação de Mestrado** Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, 78f., 2010.

CEC (Commission of the European Communities). 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**; 2003.

CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J.G.; MENEZES, M.L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba, v.14, p.93-102, 2004.

CRUZ, C. Aspectos toxicológicos de paration metílico e de extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e eficácia no controle de monogenea Dactylogyridae. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, 96f., 2005.

GRIZZLE, J.M.; ROGERS, W.A. **Anatomy and Histology of the Channel Catfish**, Auburn, Alabama, ed Auburn University, 94p, 1985.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Lewis Publishers, 2ª ed. 357p. 1995.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2007**. Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 151p. 2008.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: **Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, DF, parte D. 3, p 1-23, 1987.

JOBLING, M. Human impacts on aquatic environments. **Environmental Biology of Fishes**. Chapman & Hall, London. 1995.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v.221, p.277-287, 2003.

LOPES, R.B. Análise ecotoxicológica dos xenobióticos triclorfon e diflubenzuron empregados na aquicultura continental. **Tese de Doutorado** Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 104f, 2005.

KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; SILVA, T.O.; ANZILIERO, D.; MARTINS, D.; LORENSON, M.; MARTENINGHE, A.; SILVA, L.B. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1050-1055, 2008.

MARTINS, M.L. Doenças infecciosas e parasitárias de peixes. Jaboticabal, FUNEP, 2ª ed., 65p, 1998.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; BOZZO, F.R.; PAIVA, A.M.F.C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, p.981-985, 2002.

MEDEIROS, L.S. Toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida teflubenzuron para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*. **Dissertação de Mestrado** Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, 66 f., 2008.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva, In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M. (Eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p.343-383, 2004.

MURTHY, V.K., REDDY, Y.D., REDDY, R.M., BHASKAR, R.M., GOVINDAPPA, S., Changes in brain acetylcholinesterase activity and behavior

of freshwater fish in acid polluted environment. **Environment and Ecology**. v. 2, n. 2, p. 79-82, 1984.

OECD, **Guideline for testing of chemicals draft revised guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test**, 5p, 2008.

PEAKALL, D.B. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News Journal**. p.50-60, 1994.

PELLI, A.; PAULA, D.R.; ARRUDA, A.A.M.; LOPES, J. M.; RAMOS, S.M.; REZENDE, A.P.S. Toxicidade aguda e crônica de diflubenzuron para o jaú, *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821) (Pisces, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10, p.51-54, 2008.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Fishing News Books, Oxford, v. 30, p.339-352, 1994.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; CAMPOS, B.E.S.; EIRAS, A.C. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 329-339, 1997.

SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R. Distribuição sazonal de parasitos branquiais em diferentes espécies de peixes em pesque-pague no município de Guariba- SP, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v.14, n.4, p.141-146, 2005.

SEPA, Policy No. 29. Calicide (teflubenzuron), Authorisation for use as an in-feed sea lice treatment in marine cage salmon farms, **Risk assessment, EQS and Recommendations. Final Report** ,1999.

U.S. EPA. *Reregistration Eligibility Document: diflubenzuron*. Office of Pesticide Programs. Washington, DC. In. www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0144fact.pdf. 1999. Acesso em [04/07/2011](#).

VENTURINI, F.P. Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) exposto a concentrações subletais de trichlorfon e recuperação. **Dissertação de Mestrado** Universidade Federal de São Carlos, 90f., 2010.

WINKALER, E.U. Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Tese de Doutorado** Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, 79f., 2008.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETI, E. **Ecotoxicologia Aquática** – Princípios e Aplicações. São Carlos, Editora Rima, 478p, 2008.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure. **Acute toxicity test for freshwater fish**. (USEPA Publication 540/9-85-006). 1985.

**EFICÁCIA DO INSETICIDA TEFLUBENZURON PARA *Trichodina* sp. EM
PACU, *Piaractus mesopotamicus* E TILÁPIA, *Oreochromis niloticus***

RESUMO – A intensificação dos sistemas de produção tem provocado um aumento na ocorrência de doenças, responsáveis por perdas significativas na produção. Uma das alternativas para o controle destas parasitoses é o uso de farmoquímicos, como o teflubenzuron (TFB) um inseticida que pode ser utilizado no controle de parasitos de peixes. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a eficácia do TFB, em banhos terapêuticos, para infestações de *Trichodina* sp. em pacu, *Piaractus mesopotamicus* e tilápia, *Oreochromis niloticus* e avaliar as variáveis físicas e químicas da água. Para tanto, foi realizado um experimento com grupo controle com infestação de *Trichodina* sp. (sem tratamento) e os tratamentos nas concentrações de 30,0; 50,0; e 80,0 mg.L⁻¹ por uma hora e 50,0 mg.L⁻¹ por duas horas para o pacu e 30,0 e 50,0 mg.L⁻¹ por uma hora para a tilápia. Não ocorreu alterações nas variáveis físicas e químicas da água e o farmoquímico foi eficaz para as duas espécies obtendo-se redução no número de parasitos de 96,10% para o pacu e 87,86% para a tilápia, em relação ao grupo controle, na concentração de 80,0 e 50,0 mg.L⁻¹.

Palavras chaves: peixe, tratamento, parasito, benzoilfeniluréia, piscicultura.

1. INTRODUÇÃO

Nas produções aquícolas, os principais problemas econômicos e ecológicos estão associados aos patógenos que acometem as espécies de peixes. Estes organismos são importantes limitadores da produtividade, pois provocam atraso no crescimento e altas taxas de mortalidade dos peixes (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1997).

Entre os parasitos existentes em pisciculturas, está a *Trichodina* sp. (MELLERGAARD & DALSGAARD, 1987), que ocorrem na superfície corpórea e nas brânquias. No ambiente natural, vivem externamente nos peixes, sem causar efeitos clínicos. No entanto, por fatores ambientais como aumento da temperatura, além da exposição à outras condições inadequadas como altas densidades de peixes e aumento da matéria orgânica, estes parasitos podem proliferar rapidamente e causar sinais clínicos e mortalidade (LOM, 1973).

Entre os sinais clínicos está a produção excessiva de muco nas brânquias e na superfície do peixe, modificações comportamentais, como a presença do peixe na superfície e seu atrito corpóreo às laterais dos tanques. A gravidade dos sinais está diretamente relacionada a carga parasitária (BUCHMANN *et al.*, 1997).

Tavares-Dias *et al.* (2001) descreveu a prevalência, carga parasitária e a sazonalidade de *Trichodina* sp. em pesque-pagues no estado de São Paulo e verificou que *Leporinus macrocephalus*, *P. mesopotamicus* e *Cyprino carpio* foram as espécies mais susceptíveis à infestação deste protozoário quando comparadas ao tambacu, *Brycon cephalus*, *T. rendalli* e *O. niloticus*.

Assim, para o controle deste protozoário deve ser utilizado algum farmoquímico. O teflubenzuron (TFB) é um inseticida derivado do grupo benzoilfeniluréia com ação reguladora do crescimento de artrópodes e crustáceos e interfere diretamente na biossíntese de quitina, componente fundamental do exoesqueleto. Apesar deste farmoquímico ser utilizado na aquicultura para o controle de ectoparasitoses de peixes por ser pouco tóxico para a maioria dos vertebrados (EISLER, 1992), o TFB não tem registro no Brasil para esse fim, sendo somente para as pragas de culturas do algodão, arroz, milho, entre outras.

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* é a segunda espécie nativa mais criada no Brasil, pois trata-se de um peixe de hábito alimentar onívoro, rápido crescimento, boa qualidade de carne e de aceitação pelo mercado consumidor (JOMORI *et al.*, 2003). A tilápia, embora sendo uma espécie introduzida, que está devidamente adaptada às nossas condições climáticas (STICKNEY, 2000), e por isso, procriada no país, e responsável por 45% da produção brasileira (IBAMA, 2008).

No Brasil são poucos os estudos realizados com o objetivo de avaliar a eficácia e os efeitos secundários de drogas utilizadas no controle de doenças de peixes. Isto é particularmente verdadeiro no que se refere ao tratamento de peixes de criação (MARTINS, 1998; MARTINS *et al.*, 2002). Dessa forma, o estudo de ajuste de dosagem eficaz em condição controlada, torna-se fundamental decisão na posologia a ser administrada em estudos de mesocosmos e em condições de campo. Os ensaios de ajuste de dosagem representam uma fase intermediária nos estudos de eficácia biológica de um farmoquímico, sendo possíveis avaliar a potencialidade do produto teste, sua

influência na qualidade de água e os possíveis sinais clínicos (efeitos adversos do tratamento) dos animais.

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a eficácia do TFB, em banhos terapêuticos, no controle de *Trichodina* sp. em pacu, *P. mesopotamicus* e tilápia do Nilo, *O. niloticus*, e as variáveis físicas e químicas da água durante o experimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, Nepeam, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, campus de Jaboticabal.

O teflubenzuron (150g de ingrediente ativo) na formulação Nomolt[®] foi fornecido pela BASF S.A. Os peixes foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da Unesp e por criadores credenciados da região.

2.1. Infestação parasitária e contagem basal

Os exemplares de pacus, com peso médio de $71,01 \pm 4,34$ gramas e de tilápias com peso médio de $103,37 \pm 17,53$ gramas foram mantidos separados em caixas de 400 litros cada, em densidade de $20,0 \text{ g.L}^{-1}$. Esses peixes foram submetidos as seguintes condições: baixa concentração de oxigênio dissolvido ($> 4,0 \text{ mg.L}^{-1}$), excesso de matéria orgânica, com alimentação a cada 48 horas e com captura periódica (CARRASCHI *et. al.*, 2011). Após esse processo uma

amostra (n=10) foi submetida à raspagem do epitélio da superfície corporal e coleta das brânquias para caracterização e contagem basal de parasitos. Na contagem basal os peixes apresentaram em média 200 *Trichodina* sp./peixe.

2.2. Procedimento Experimental

Após essa coleta foram selecionados 75 exemplares de pacus e 45 tilápias, distribuídas aleatoriamente em nove caixas de 60 litros, com fluxo contínuo e alimentados com 1,5% peso vivo de ração, uma vez ao dia.

Para a determinação da eficácia do TFB foram testadas, na forma de banho terapêutico, com aplicações diárias durante cinco dias, quatro concentrações de TFB para o pacu: 30,0; 50,0 e 80,0 mg.L⁻¹ com o tempo de exposição de uma hora e 50,0 mg.L⁻¹ por duas horas. Para a tilápia foram testadas duas concentrações: 30,0 e 50,0 mg.L⁻¹ por uma hora de exposição. Para as duas espécies os tratamentos foram feitos com três repetições e cinco peixes por repetição.

Antes da aplicação, foi fechado o fluxo de água das caixas e foi retirado um litro de água de todas as caixas. Após esse procedimento o produto foi administrado e o fluxo das caixas permaneceu fechado pelo tempo de exposição estipulado para o tratamento.

A mortalidade, definida como parada do batimento opercular e imobilidade, foi anotada a cada 24 horas e os peixes mortos retirados das caixas. No sexto dia, todos os exemplares restantes foram eutanasiados e submetidos a raspagem do epitélio da superfície corporal.

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para verificar as diferenças entre os tratamentos. A determinação da eficácia no tratamento dos parasitos presentes na superfície corporal, foi calculada de acordo com fórmula do “Guideline for the Testing of Veterinary Medicinal Products” e ONAKA (2001):

$$Ef = (MCont - Mtrat/Mcont) \times 100$$

Em que:

Ef = eficácia do controle de parasitos (%);

MTrat = média do número de parasitos nos grupos tratados;

Mcont = média do número de parasito no tratamento testemunho.

As variáveis físicas e químicas da água: temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹) e condutividade elétrica (μS.cm⁻¹) foram monitorados em 0 hora, 1, 3 e 5 dias após a aplicação do TFB, com o auxílio de um aparelho de multiparâmetros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os dois experimentos, ocorreu variação significativa (p<0,05) do número de parasitos, de *Trichodina* sp.

Para *P. mesopotamicus*, após cinco dias de tratamento, ocorreu diminuição do número de parasitos do controle de ± 171,5 parasitos/peixe para ± 6,5

amostrado no tratamento com 80,0 mg.L⁻¹ (Tabela 1). Para *O. niloticus*, ao final do tratamento, ocorreu diminuição do número de parasitos do controle de $\pm 140,0$ parasitos/peixe para $\pm 17,0$ amostrado no tratamento com 50,0 mg.L⁻¹ (Tabela 1).

No final de cinco dias de tratamento com o TFB, ocorreu diminuição na porcentagem de parasitos/peixe de 96,1% e 87,9% em relação aos peixes do grupo controle de pacu e tilápia, respectivamente. A dose mais eficaz controle de *Trichodina* sp. para o pacu foi de 80,0 mg.L⁻¹ e para a tilápia foi de 50,0 mg.L⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios do número de *Trichodina* sp./peixe e porcentagem de eficácia após o tratamento com o TFB em pacu, *P. mesopotamicus* e tilápia *O. niloticus*.

Tratamentos (mg.L ⁻¹)	Tempo de exposição (h)	Pacu <i>P. mesopotamicus</i>		Tilápia <i>O. niloticus</i>	
		Número	Eficácia (%)	Número	Eficácia (%)
0,0	1	171,5 $\pm$ 0,0 A	-	140,0 $\pm$ 0,0 A	-
30,0	1	110,8 $\pm$ 83,6 AB	62,8	23,1 $\pm$ 24,5 B	83,5
50,0	1	63,2 $\pm$ 24,5 B	64,1	17,0 $\pm$ 24,5B	87,9
50,0	2	8,8 $\pm$ 14,47 C	94,7	-	-
80,0	1	6,5 $\pm$ 10,64 C	96,1	-	-

Valores seguidos por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Pacu F= 21,62** e Tilápia F= 120.17 **

Os maiores índices de sobrevivência foram verificados nas maiores concentrações para as duas espécies, sendo 100% de sobrevivência para o pacu e 93,33% para a tilápia. A alta taxa de mortalidade do grupo controle da

tilápia foi atribuído a bacterioses que acometeram os peixes devido a baixa imunidade, consequente da alta infestação parasitária (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevivência durante o experimento de eficácia do TFB para o pacu, *P. mesopotamicus* e tilápia *O. niloticus*.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Tempo de exposição (h)	Sobrevivência (%)	
		Pacu	Tilápia
0,0	1	100,00	13,33
30,0	1	86,66	60,00
50,0	1	100,00	93,33
50,0	2	86,66	-
80,0	1	100,00	-

As variáveis físicas e químicas da água não apresentaram alterações para as duas espécies durante o experimento (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Valores das variáveis físicas e químicas da água durante o experimento de eficácia do TFB para o pacu, *P. mesopotamicus*.

Conc (mg.L ⁻¹)	T (°C)	Cond Elétrica (μS.cm ⁻¹)	OD (mg.L ⁻¹)	pH
0,0	23,68 ± 0,52	0,182 ± 1,69	2,08 ± 0,07	8,4 ± 0,05
30	23,93 ± 0,51	0,182 ± 1,75	1,93 ± 0,07	8,4 ± 0,03
50	23,53 ± 0,07	0,181 ± 0,38	1,94 ± 0,04	8,4 ± 0,02
50	24,41 ± 1,55	0,180 ± 1,03	2,14 ± 0,14	8,1 ± 0,08
80	23,40 ± 0,07	0,182 ± 1,65	2,02 ± 0,09	8,3 ± 0,05

T = Temperatura, Cond Elétrica = Condutividade elétrica, OD = Oxigênio Dissolvido

Tabela 4. Valores das variáveis físicas e químicas da água durante o experimento de eficácia do TFB para a tilápia, *O. niloticus*.

Conc (mg.L ⁻¹)	T (°C)	Cond Elétrica (µS.cm ⁻¹)	OD (mg.L ⁻¹)	pH
0,0	27,76 ± 0,02	0,182 ± 1,34	1,60 ± 0,04	8,3 ± 0,05
30	27,30 ± 0,26	0,182 ± 1,80	1,66 ± 0,06	8,3 ± 0,03
50	23,53 ± 0,07	0,175 ± 2,15	1,65 ± 0,05	8,3 ± 0,04

T = Temperatura, Cond Elétrica = Condutividade elétrica, OD = Oxigênio Dissolvido

O TFB foi menos eficaz administrado via oral na dose 10 mg/kg/peixe pelo período um a sete dias consecutivos no controle do copépodo *Lepeophtheirus salmonis* em salmão em testes conduzidos a temperaturas entre 11 e 15°C com redução no número de parasitos em 83,4 e 86,4% (BRANSON *et al.*, 2000). Toksen (2010) não observou eficácia do TFB contra larvas e adultos do copépodo *Lernanthropus kroyeri*, administrado via oral em doses de 10,0 e 20,0 mg.kg⁻¹ de biomassa dia⁻¹ durante sete dias consecutivos para a mesma espécie.

Neste estudo, as concentrações e a redução na carga parasitária foi maior em relação aos trabalhos mencionados, com o tempo de exposição menor. Isto sugere que o aumento da eficácia seja proporcional tanto pelo tempo de exposição quanto pela concentração utilizada. Em relação do aumento da concentração, por se tratar de um farmoquímico seguro, que não causa de risco de intoxicação ambiental, esse aumento não causaria prejuízo aos animais.

Balta *et al.* (2008) avaliaram a toxicidade e a eficácia dos farmoquímicos: formaldeído, triclorfon, diclorvós, amitraz, cipermetrina, Permanganato de Potássio, cloramina-T, sal e vinagre contra infestações naturais de *I. multifiliis*, *I. necator* e *Trichodina* sp. em alevinos e jovens de três espécies de truta. Assim como o TFB, o formaldeído ($0,15 \text{ mL.L}^{-1}$), o sal ($20,0 \text{ g.L}^{-1}$) e o vinagre, (4% de ácido acético, $10,0 \text{ mL.L}^{-1}$), também não foram tóxicos para os peixes e eficazes para tratar as infestações de todos os protozoários. Apesar do permanganato de potássio ($10,0$ a $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$) ter sido eficaz contra os parasitos, ele foi considerado tóxico para a truta. Ao contrário, o triclorfom, diclorvós, amitraz, cipermetrina cloraminas-T não foram eficazes no tratamento dos ectoparasitos. Já toltrazuril (TOL), um farmoquímico derivado de triazina que controla coccídeos, demonstrou eficácia contra *Trichodina* sp. na concentração de $10,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 2 a 4 horas e na concentração de $50,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 20 minutos (MEHLHORN *et al.*, 1988).

A associação de farmoquímicos também é utilizada para o controle de protozoários ectoparasitos. Diggles (2010) utilizou em *Colistium nudipinnis* $25,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de formalina + $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ de verde malaquita por 24 h e observou 100% eficácia contra *Trichodina* sp., mantendo 100% de sobrevivência dos peixes.

Chitmanat *et al.* (2005a) observaram 100% de eficácia contra *Trichodina* sp. utilizando o extrato aquoso de folhas de amendoeira *Terminalia catappa* em jovens de tilápias do Nilo após 2 dias de tratamento, na concentração de $800,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Chitmanat *et al.* (2005b), usando extrato de alho para banhos numa concentração de $800,0 \text{ mg.L}^{-1}$, conseguiram eliminar 100% do ectoparasita *Trichodina* sp. em tilápias do Nilo em 2 dias. Elsayed & El-Deen (2010) utilizaram extrato de chá verde (GTE) *Camellia sinensis* nas

concentrações de 0,05% por 15 minutos ou GTE 0,9% para 5 min em banhos terapêuticos para alevinos de tilápias, resultando em uma diminuição de 80% e 95% do número de *Trichodina* sp. na pele.

4. CONCLUSÃO

O teflubenzuron reduziu significativamente o número de *Trichodina* sp. infestando o pacu, *P. mesopotamicus* e a tilápia, *O.niloticus*, sem alterar as variáveis físicas e químicas da água. Este estudo serve de base para encontrar a melhor dose a ser utilizada em ensaios com mesocosmos e no campo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALTA. F., KAYIS, S., ALTINOK, I. External protozoan parasites in three trout species in the Eastern Black Sea region of the Turkey: intensity, seasonality, and their treatments. **Bulletin European Association Fish Pathology** v.28, n.4, p.157, 2008.

BRANSON, E.J.; RONSBERG, S.S; RITCHIE, G. Efficacy of teflubenzuron (Calicide®) for the treatment of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer 1838), infestations of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Research** v. 31, p. 861-867, 2000.

BUCHMANN, K.; LINDENSTROM, T.; BRESCIANI, J. Defence mechanisms against parasites in fish and the prospect for vaccines. **Acta Parasitologica** v. 46, p.71–81, 1997.

CARRASCHI, S.P.; CRUZ, C.; MACHADO NETO, J.G.; CASTRO, M.P.; BORTOLUZZI, N.L.; GIRIO, A.C.F. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p.579-583, 2011.

CHITMANAT, C.; TONGDONMUAN, K.; KHANOM, P.; PACHONTIS, P.; NUNSONG, W. Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* Linn solution against some tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.678, p.179-182, 2005a.

CHITMANAT, C.; TONGDONMUAN, K.; NUNSONG, W. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* spp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Songklanakarin Journal Science and Technology**, Songkhla, v.27, n.1, p.359-364, 2005b.

DIGGLES, B.K. Chemotherapy of the ciliate *Trichodina* sp. on juvenile turbot (*Colistium nudipinnis*) with notes on the susceptibility of fish with abnormal pigmentation. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v.34, p.645-652, 2000.

EISLER, R., Diflubenzuron hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. **Fish Wildlife service and biological report**, Shepherdstown, v.4, n.25, p.1-36. 1992.

ELSAYED, A.I.; EL- DEEN, N., Green tea extract Role in removing the *Trichodina* sp. on *Oreochromis niloticus* fry in the Egyptian fish hatcheries. **Report and Opinion**, v.2, n.8, p. 77 – 81, 2010.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2007**. Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 151p. 2008.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v.221, p.277-287, 2003.

LOM, J. The adhesive of *Trichodinella epizopotica*: Ultra structure and injury to the host tissue. **Folia Parasitologica**, Praga, v.20, p.193- 202, 1973.

MARTINS, M.L. **Doenças infecciosas e parasitárias de peixes**. Jaboticabal, FUNEP, 65p, 1998.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; BOZZO, F.R.; PAIVA, A.M.F.C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, p.981-985, 2002.

MEHLHORN, H.; SCHMAHL, G.; HABERKORN, A. Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. Short communication. **Parasitology Research**, v. 75, p. 64-66, 1988.

MELLERGAARD S.; DALSGAARD, I., Disease problems in Danish eel farms. **Aquaculture** v. 67, p.139–146, 1987.

ONAKA, E.M. Eficácia do albendazol e do levamisol no controle de parasitos monogenóides e eventuais alterações no hemograma do Pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes: Characidae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp, CAUNESP, 104f., 2001.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; CAMPOS, B.E.S.; EIRAS, A.C. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 329-339, 1997.

STICKNEY, R.R. Status of research on tilápia In: Costa- Pierce, B.A.; Rakocy, J.E. **Tilapia aquaculture in the Americas**. Louisiana: World Aquaculture Society, v. 2, p. 21-33, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. Protozoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.18, p. 67-79, 2001.

TOKSEN, E. [The effect of Teflubenzuron on the control of *Lernanthropus kroyeri* \(van Beneden, 1851\) \(Lernanthropidae\) infestations in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* \(Linnaeus, 1758\)](#). **Bulletin Of The European Association Of Fish Pathologists**, v.30, n.6, p.205-210, 2010.

ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS EM PACU, *Piaractus mesopotamicus* EXPOSTOS AO INSETICIDA TEFLUBENZURON

RESUMO

A intensificação dos sistemas de produção aquícola tem favorecido o aparecimento de doenças provocadas por parasitos. Estes podem causar aumento no custo e perdas significativas na produção, uma vez que podem provocar altas taxas de mortalidade ou efeitos negativos no desempenho dos animais. Dessa forma, ocorre aumento da demanda do uso de farmoquímicos para controlar essas doenças, e o teflubenzuron (TFB) é um inseticida amplamente utilizado para o controle de parasitos de peixes, com potencial para o uso na aquicultura brasileira. As alterações hematológicas que surgem com a evolução dos processos patológicos são imprescindíveis para o estudo das enfermidades que acometem os peixes. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar as possíveis alterações hematológicas em pacu, *P. mesopotamicus* expostos ao TFB assim como as variáveis físicas e químicas da água durante o experimento. Após a exposição do TFB, ocorreu aumento no número de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e linfócitos e diminuição no CHCM nos peixes do tratamento (50,0 mg.L⁻¹) em relação ao controle. Não ocorreu alteração nas variáveis físicas e químicas da água durante o experimento.

Palavras-chave: farmoquímico, aquicultura, tratamento, doença.

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura intensiva consiste em densidades populacionais muito elevadas e em grande aumento de produtividade quando comparadas com as populações naturais, onde se verificam modificações extremamente pronunciadas nos ecossistemas. O número de parasitos aumenta em ambientes confinados e sua reprodução depende, em parte, da qualidade de água e da densidade de estocagem. A eutrofização do ambiente aquático, a baixa concentração de oxigênio dissolvido e a alta densidade de estocagem são causadores de estresse aos peixes, predispondo os às doenças (AZEVEDO *et al.*, 2006).

O teflubenzuron (TFB) é um inseticida derivado da uréia com ação reguladora do crescimento de artrópodes e crustáceos, interfere na biossíntese de quitina e pode ser utilizado na aquicultura para o controle de parasitoses de peixes, sendo considerado pouco tóxico para a maioria dos vertebrados (WINKALER, 2008 e MEDEIROS, 2008).

Muitas doenças que acometem os peixes causam anormalidades no sangue e em seus constituintes, sendo estes distúrbios caracterizados por alterações na estrutura, função ou nos mecanismos de coagulação (CLAUSS *et al.*, 2008). Estas alterações ocorrem em condições clínicas com distúrbios da homeostase orgânica, sendo determinadas por diferentes tipos de agentes infecciosos, parasitários, químicos, físicos, além de metabólicos e nutricionais (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Os parâmetros sanguíneos podem ser usados como indicadores biológicos no monitoramento da saúde dos peixes e do ambiente, como rápida

ferramenta na identificação do estresse que o ambiente e os parasitos podem impor aos peixes. Essas informações podem ser utilizadas para avaliar o estado fisiológico de peixes, padronizando as condições ideais para o seu cultivo (ARAUJO *et al.*, 2009). Estudos anteriores foram realizados determinando os parâmetros sanguíneos para *P. mesopotamicus* exposto ao sulfato de cobre (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002); em *Colossoma macropomum* exposto ao mebendazol (CHAGAS *et al.*, 2006); em *Labeo rohita* exposto a cipermetrina e carbofuran (ADHIKARI, 2003); em *Rhamdia quelen* exposto ao herbicida clomazone (CRESTANI, 2005) e em *Oreochromis niloticus* exposto aos inseticidas dimetoato e malation (SWEILUM, 2006).

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar as possíveis alterações hematológicas em pacu, *P. mesopotamicus* expostos ao inseticida teflubenzuron, além das variáveis físicas e químicas da água durante o experimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, Nepeam, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, campus de Jaboticabal.

O teflubenzuron (150g de ingrediente ativo) na formulação Nomolt[®] foi fornecido pela BASF S.A. Os peixes foram fornecidos pelo Centro de Aquicultura da Unesp e por criadores credenciados da região.

Foram selecionados 90 exemplares de pacus, com peso médio de $131,19 \pm 3,61$ gr, distribuídos aleatoriamente em seis tanques com capacidade de 400 litros com fluxo contínuo e alimentados com 1,5% peso vivo de ração comercial com teor de 32% de proteína, uma vez ao dia.

Os peixes foram expostos, na forma de banho terapêutico, a concentração de $50,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TFB mais o controle, com aplicações diárias consecutivas durante cinco dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições e quinze ($n=15$) por grupo.

Antes da aplicação, foi fechado o fluxo de água dos tanques e foram retirados quatro litros de água de todos os tanques. Após esse procedimento o produto foi administrado e o fluxo das caixas permaneceu fechado por duas horas.

A mortalidade, definida como parada do batimento opercular e imobilidade, foi anotada a cada 24 horas e os peixes mortos retirados dos tanques.

As amostras de sangue dos peixes foram colhidas após término do período experimental. Os peixes foram anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) e uma alíquota de sangue coletada por punção do vaso caudal. Deste material realizou-se o hematócrito (Ht) pelo método do microhematócrito, da taxa de hemoglobina (Hb) pelo método da cianometahemoglobina, do número de eritrócitos (Er) contados em câmara de Neubauer utilizando-se a solução salina 0,7% como diluente e o cálculo dos índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). As contagens total e diferencial de leucócitos e trombócitos foram realizadas pelo método indireto segundo Hrubé & Smith (1998) em extensões

sangüíneas coradas por corantes hematológicos May-Grünwald e Giemsa, segundo metodologia de Rosenfeld (1947).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey 5% para verificar as diferenças entre os tratamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a exposição do TFB, ocorreu aumento no número de eritrócitos, no número de leucócitos totais, de trombócitos totais e linfócitos, além da diminuição do CHCM dos peixes do tratamento em relação ao controle (Tabela 1).

As alterações histopatológicas nas brânquias, onde foram observadas estase no interior das lamelas secundárias, fundamentam a elevação do número de eritrócitos e do hematócrito, mesmo que este último não tenha sido significativo (Tabela 1). Esse aumento deve ter sido compensatório visto que as brânquias ficaram fragilizadas pela exposição do TFB.

O aumento no número de trombócitos, leucócitos e linfócitos pode ser resultado do efeito secundário do estresse sofrido pelos peixes. Nesses animais expostos a hipoxia, de origem ambiental ou fisiológica, as catecolaminas atuam em vários locais otimizando a transferência de oxigênio para os tecidos. Entre as suas ações estão a contração esplênica do baço, que resulta na liberação de eritrócitos para a circulação, o controle do ambiente intraeritrocitário, o aumento da perfusão branquial, entre outras (RANDALL & PERRY, 1992).

Alterações hematológicas podem ser indicadoras do estado fisiológico do peixe já que a função do sangue no organismo é manter a estabilidade dos tecidos e o ambiente interno constante. Essas alterações são um dos primeiros reflexos detectáveis de estresse ambiental. Isso porque, segundo Heath (1995) o estresse pode causar hemoconcentração em muitas espécies de peixes, o que pode ser uma consequência do aumento da diurese causada pela presença de contaminantes. Também pode ocorrer uma variação no conteúdo de hemoglobina do peixe, ou ainda, no tamanho dos eritrócitos, como estratégia de adaptação aos estressores.

Vários estudos têm mostrado que a exposição crônica a alguns estressores pode induzir anemia (prejudicando a formação da hemoglobina), enquanto outros causam aumento no hematócrito ou no conteúdo de hemoglobina, normalmente decorrente de hipóxia interna devido a danos nas brânquias (HEATH, 1995).

Os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação, sendo sua principal função o transporte de oxigênio (RANZANI-PAIVA, 1997). Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa humoral e celular do organismo dos peixes (TAVARES-DIAS & MORAES, 2007), os quais utilizam a via sanguínea para realizar o monitoramento de possíveis infecções e danos teciduais. Em peixes teleósteos é comum a ocorrência de leucócitos em diferentes fases de maturação no sangue periférico (RANZANI-PAIVA, 1995). Os trombócitos de peixes também possuem fundamental importância na defesa orgânica. Além de promover a hemostasia, estas células podem desempenhar função fagocítica (BURROWS *et al.*, 2001), além da sua habilidade de migrar para o foco inflamatório (MARTINS *et al.*, 2008).

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros da série vermelha de pacu, *P. mesopotamicus* exposto ao TFB.

Concentração	Controle	50,0 mg.L ⁻¹
Eritrócitos (10 ³ μ L ⁻¹)	1528,30 $\pm$ 0,16 A	1708,90 $\pm$ 0,18 B
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	8,75 $\pm$ 0,56 A	8,40 $\pm$ 0,34 A
Hematócrito (%)	31,44 $\pm$ 4,06 A	34,56 $\pm$ 2,52 A
VCM (fL)	206,99 $\pm$ 27,39 A	204,15 $\pm$ 25,50 A
CHCM (g.dL ⁻¹)	28,03 $\pm$ 2,11 A	24,37 $\pm$ 1,35 B

Valores seguidos por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão dos parâmetros da série branca de pacu, *P. mesopotamicus* exposto ao TFB.

Concentração	Controle	50,0 mg.L ⁻¹
Trombócitos (10⁶ μL⁻¹)	17.911,44 $\pm$ 6607 A	27.558,89 $\pm$ 6758 B
Leucócitos (10⁶ μL⁻¹)	11.639,33 $\pm$ 3216 A	16.836,89 $\pm$ 4854 B
Linfócitos (10⁶ μL⁻¹)	10.982,66 $\pm$ 2841 A	16.083,33 $\pm$ 4549 B
Monócitos (10⁶ μL⁻¹)	458,77 $\pm$ 239 A	453,66 $\pm$ 341 A
Neutrófilos (10⁶ μL⁻¹)	231,22 $\pm$ 199 A	279,33 $\pm$ 229 A
Basófilos (10⁶ μL⁻¹)	0,0 $\pm$ 0,0 A	0,00 $\pm$ 0,0 A
Eosinófilos (10⁶ μL⁻¹)	138,33 $\pm$ 156 A	87,55 $\pm$ 93 A
CGE (10⁶ μL⁻¹)	58,00 $\pm$ 56 A	131,22 $\pm$ 100 A
LI (10⁶ μL⁻¹)	84,22 $\pm$ 82 A	142,55 $\pm$ 175 A

Células Granulocíticas Especiais (CGE) Leucócito imaturo (LI). Valores seguidos por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Durante o experimento não ocorreu alteração significativa nas variáveis físicas e químicas da água (Tabela 3).

Tabela 3. Valores das variáveis físicas e químicas da água durante a exposição do teflubenzuron para o pacu, *P. mesopotamicus*.

Conc (mg.L ⁻¹)	T (°C)	Cond elétrica (μs.cm ⁻¹)	OD (mg.L ⁻¹)	pH
0,0	30,73 ± 1,13	0,197 ± 0,00	5,72 ± 0,28	8,2 ± 0,05
50,0	30,62 ± 1,16	0,197 ± 0,00	5,34 ± 0,84	8,2 ± 0,20

T = Temperatura, Cond elétrica = Condutividade elétrica, OD = Oxigênio Dissolvido



Figura 1. Leucócitos presentes nos peixes do controle. Er: Eritrócito Mn: monócito; Tb: trombócito; Es: eosinófilo; Nt: neutrófilo. Coloração Rosenfeld. Aumento 1000X.

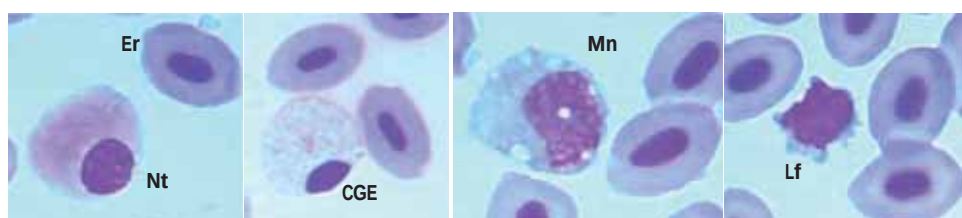


Figura 2. Leucócitos presentes nos peixes expostos ao TFB. Er: Eritrócito CGE: célula granulocítica especial. Mn: monócito; Tb: trombócito; Nt: neutrófilo; Lf: linfócito. Coloração Rosenfeld. Aumento 1000X.

Embora não haja trabalhos na literatura relacionados a alterações hematológicas em peixes expostos ao TFB, mas há descrições de alterações no quadro sanguíneo a outros farmoquímicos utilizados na aquicultura no controle de ectoparasitos. Tavares-Dias *et al.*, (2002) observaram alterações significativas na contagem de eritrócitos, leucócitos, concentração da

hemoglobina corpuscular média (CHCM) em *P. mesopotamicus* infestados com *Anacanthorus penilabiatus* e tratados com sulfato de cobre (CuSO₄).

Em *Prochilodus scrofa* tratados com trichlorfon ocorreu uma redução nos valores de todos os parâmetros da série vermelha, com exceção do VCM. Também foi observado uma redução da porcentagem de linfócitos e acréscimo na de neutrófilos na série branca (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1997). Após o tratamento com organofosforado em *P. mesopotamicus* parasitado por *Argulus* sp., Tavares-Dias *et al.* (1999) verificaram redução do número de eritrócitos e da taxa de hemoglobina.

Em *Cyprinus carpio*, foi verificado que, após uma significativa diminuição no número total de *Argulus* sp. devido ao tratamento com Neguvon®, ocorreu um aumento dos valores hematológicos como número de eritrócitos, leucócitos e CHCM (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1987). Já Onaka *et al.* (2003), verificou relativa eficácia no controle de parasitos no pacu e que após o tratamento com o levamisol a anemia apresentada pelos peixes parasitados desapareceu.

4. CONCLUSÃO

O TFB na concentração de 50,0 mg.L⁻¹ para o pacu, *P. mesopotamicus* causa alteração dos parâmetros hematológicos, mas preservando as variáveis físicas e químicas da água.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, S; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C.T.; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton), **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.58, p.220–226, 2004.

ARAUJO, C.S.O. ; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A.L.S.; ANDRADE, S.M.S.; LEMOS, J.R.G.; OLIVEIRA, A.T. ; CRUZ, V.R ; AFFONSO, E.G. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: Tavares-Dias, M. (Org.). **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. 1 ed. Macapa, AP: Embrapa Amapa, v.1, p.389-424, 2009.

AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; BOZZO, F.R. Hematological and gill responses in parasitized tilapia from Valley of Tijucas River, SC, Brazil. **Scientia Agricola**, v.63, p.115-120, 2006.

BURROWS, A.S.; FLETCHER, T.C.; MANNING, M.J. Haematology of the turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. **Journal Applied Ichthyology**, v.7, p.77-84, 2001.

CHAGAS, E.C.; ARAÚJO, L.D.; SILVA, A.L.F.; GOMES, L.C.; BRANDÃO, F. R. Respostas fisiológicas de tambaqui a banhos terapêuticos com mebendazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.4, p.713-716, 2006.

CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish. **Veterinary Clinical Exotic Animals**, v.11, p.445–462, 2008.

CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D.S.; LAZZARI, R.; DUARTE, M.F.; MORSCH, V.M.; PIPPI, A.L.; VIEIRA, V.P. Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.65, p.48–55, 2006.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Lewis Publishers, 2^a ed. 357p. 1995.

HRUBE, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: **Schalm`s Veterinary Hematology**, 5^aed. p.1120-1125, 1998.

MARTINS, M.L.; MIYAZAKI, D.M.Y.; MORAES, F.R.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W.B.; MOURIÑO, J.L.P. Suplementação com vitamina C e E influencia a resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus*. **Ciência Rural**, v.38, p.213-218, 2008.

MEDEIROS, L.S. Toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida teflubenzuron para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e *Poecilia reticulata*. **Dissertação de Mestrado** Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, 66f., 2008.

ONAKA, E.M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Eficácia do albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes:Characidae). I. Banhos terapêuticos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.29, n.2, p.101-107, 2003.

RANDALL, D.J.; PERRY, S.F. The Cardiovascular System: Catecholamines, In **Fish Physiology**, v. 12, p. 255–300, 1992.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; PORTELLA, M.C.; CERIBERTO, R.J. 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).

Boletim do Instituto de pesca, v.14, p.83-92, 1987.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP. (Lat. 25°00'S – Long. 47°55'W).

Boletim Instituto de Pesca, v.22, p.23-40, 1995.

RANZANI-PAIVA, M.J. T.; ISHIKAWA, C.M.; DE CAMPOS, B.E.S.; EIRAS, A.C. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananeia, Sao Paulo, Brazil.

Revista Brasileira de Zoologia, v.14, n.2, p.329-339, 1997.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores.

Memórias do Instituto Butantã, v.20, p.315-328, 1947.

SWEILUM, M.A. Effect of sublethal toxicity of some pesticides on growth parameters, haematological properties and total production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and water quality of ponds. **Aquaculture Research**, v.37, p.1079-1089, 2006.

TAVARES-DIAS, M; MARTINS, M.L. KRONKA, S.N. Evaluation of the hematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes: Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n.2, p.553-555, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; SCHALCH, S,H,C.; ONAKA, E.M.; QUINTANA, C.I.F.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄), **Acta Scientiarium**, v.24, n.2, p.547-554, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: **Villimpress**, 143p, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal Applied Ichthyology**, v.23, p.709–712, 2007.

WINKALER, E.U. Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Tese de Doutorado** Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP, 79f., 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em caso de um possível registro do TFB para o uso na aquicultura, mesmo sendo praticamente não-tóxico para a macrófita aquática *Lemna minor*, o peixe *H. eques* e o caramujo *P. canaliculata*, este farmoquímico seria classificado como altamente tóxico devido a elevada toxicidade para o microcrustáceo *D. magna*, tornando seu uso restrito e devendo ser evitado em tanques de larvicultura com fertilização natural.
- O TFB é praticamente não-tóxico e não causaria risco de intoxicação para o *P. mesopotamicus* em uma possível contaminação deste xenobiótico no ambiente. No entanto, mesmo não ocorrendo mortalidade durante o ensaio, foi constatado que ele causa efeito crônico caracterizado por alterações histopatológicas reversíveis.
- Com redução de 96,1% no número de *Trichodina* sp. em pacu, o TFB foi considerado eficaz no controle deste parasito, comprovando seu possível uso na aquicultura.
- A exposição do TFB causou hemoconcentração e leucocitose em *P. mesopotamicus*.