

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
Câmpus de Jaboticabal**

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

Claudinei da Cruz
Biólogo

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura de Águas Continentais como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura de Águas Continentais.

Jaboticabal

-2005-

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
Câmpus de Jaboticabal**

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

Autor: Claudinei da Cruz

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes

Jaboticabal

-2005-

Cruz, Claudinei da
C957a Aspectos toxicológicos de parathion metílico e de extrato aquoso de folhas secas de nim (*azadirachta indica*) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e eficácia no controle de monogenea Dactylogyridae/ Claudinei da Cruz. – – Jaboticabal, 2001
vii, 96 f. il. 2; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da UNESP, 2005
Orientador: Joaquim Gonçalves Machado Neto
Banca examinadora: Flávio Ruas de Moreas, Maurício Laterça Martins, Robinson Antonio Pitelli, Julio Vicente Lorbardi
Bibliografia

1. Peixes. 2. Sanidade. 3. toxicologia. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura da UNESP.

CDU 639.3.09

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

Dedico,

Aos meus Pais, ***João Pedro da Cruz e Luzia Inês Candido da Cruz***, obrigado por vosso amor, carinho, dedicação, compreensão e ensinamentos de vida e ao meu irmão, ***Braz Aparecido da Cruz***, pelo amor e grande amizade.

Ofereço,

A ***Karina Simões***, por seu carinho, amizade e por sua compressão nos momentos difíceis durante a realização deste trabalho. Obrigado por sempre estar ao meu lado.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto pela brilhante orientação, amizade, dedicação e principalmente pela confiança e oportunidade para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes, do Departamento de Química da FC/UNESP/Bauru, pela co-orientação deste trabalho, amizade, dedicação e exemplo de pesquisador e a acadêmica em Ciências Biológicas da FC/UNESP/Bauru, Andreli Cristina Dalberto, pela padronização do método analítico, amizade e dedicação.

A Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado, do Departamento de Anatomia da FCAV/UNESP/Jaboticabal, pela amizade e confiança.

A Profa. Dra. Karina Simões, da UNIMEP/Lins, pela amizade e ajuda em todas as fases de desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Maurício Leite de Oliveira do Laboratório de Ecotoxicologia e Matheus Nicolino Peixoto Henares do NEPEAM, pela amizade conquistada, companheirismo, pela confiança e ajuda na execução dos experimentos.

Ao meu amigo Rodrigo Yudi Fujimoto, do Laboratório de Patologia de Organismos aquáticos do CAUNESP, pela amizade, companheirismo, incentivo e por participar de todas as fases deste trabalho.

As minhas amigas Adriana Cristina Januário e Ana Carolina Martinelli, Médicas Veterinárias, e Regiane Cristina de Oliveira, do Curso de doutorado de Entomologia da FCAV pelo companheirismo e por vossa amizade nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos amigos do Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV, Cecília Maria Costa do Amaral, Ana Carolina Martinelli, Adriana Cristina Januário, Carolina Martins, Gregório Correa Guimarães, André Serrano, pela amizade

conquistada, pelos momentos felizes e engraçados de nossa convivência no setor e pela ajuda nas coletas no processamento e análise do material histológico.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade Maria Isabel Vitale, Raquel Matassa de Assis, Gilson José Leite pela convivência e por vossa amizade e as funcionárias de Laboratório de Ecotoxicologia e Saúde Ocupacional, Daniele Avilez Duo e Eliége Cristina José, por vossa amizade, pelos momentos felizes de nossa convivência e pela ajuda na execução dos experimentos.

Aos amigos da república Rodrigo Yudi Fujimoto “Pai”, Atomu Furoawara, Marcel José dos Santos “Cão”, Alexandre Rodrigo Mendes Fernandes “Boi” Gustavo Dias Silveira “Varetuxo” e Ronald Kennedy “Frango” pela amizade, pela compreensão, pelos momentos felizes e tristes compartilhados.

Aos funcionários Valdecir Fernandes de Lima e José Roberto Polachini, do Setor de Carcinocultura do CAUNESP, pela amizade e pelas análises de qualidade de água dos experimentos e ao funcionário Marcio Alves do Santos, do Setor de Reprodução de Tilápias, por sua amizade e ajuda.

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro, do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho e pela grande amizade.

Ao prof. Dr. Robinson Antônio Pitelli e ao Prof. Dr. Flavio Ruas de Moraes pelas contribuições e correções realizadas neste trabalho no exame de qualificação.

Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Processos: 142151/2001-7 (bolsa de doutorado) e 477882/2003-0 (edital universal 2002).

Enfim, a todos que participaram de alguma forma neste trabalho. Muito obrigado.

“Hoje levantei pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia-noite. É minha função escolher que tipo de dia terei hoje. Posso reclamar que está chovendo ou agradecer as águas por levarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo. Posso me queixar dos meus pais por não terem dado o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para morar. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saírem como planejei, posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente, esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar a forma. Tudo depende de mim...”

Charles Chaplin.

ÍNDICE

Capítulo 1. Considerações Gerais	01
RESUMO	01
SUMMARY	02
1. INTRODUÇÃO	03

2. OBJETIVOS	
05	
3. REVISÃO DE LITERATURA	
06	
3.1. A importância do pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) para a aquicultura brasileira e ação dos parasitos monogenéticos nos peixes	06
3.2. Efeitos dos organofosforados e da azadiractina nos organismos aquáticos	08
3.3. Preparação e utilização de análises cromatográficas para a determinação de resíduos em peixes	10
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
Capítulo 2. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim (<i>Azadirachta indica</i>) para alevino e jovem de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	20
RESUMO	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Testes preliminares e de controle de sensibilidade dos organismos-teste	24
2.2. Determinação da toxicidade aguda (CL (I) _{50-96h}) do paration metílico	25
2.3. Determinação da azadiractina contida no EAFSN	26
2.4. Determinação da toxicidade aguda (CL (I) _{50-96h}) da azadiractina contida no EAFSN	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. Paration metílico	27
3.2. Azadiractina	29
4. CONCLUSÕES	31
5. ABSTRACT	32
6. AGRADECIMENTOS	33

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
-------------------------------	----

Capítulo 3. Histopatologia de brânquia e fígado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> exposto a concentrações subagudas do inseticida paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim	38
---	-----------

RESUMO	39
--------	----

ABSTRACT	40
----------	----

1. INTRODUÇÃO	41
---------------	----

2. MATERIAL E MÉTODOS	43
-----------------------	----

2.1. Análise histológica da brânquia e do fígado

44

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
---------------------------	----

3.1. Histopatologia de brânquias	45
----------------------------------	----

3.2. Histopatologia do fígado	50
-------------------------------	----

4. AGRADECIMENTOS	54
-------------------	----

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
-------------------------------	----

Capítulo 4 Eficácia do inseticida paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim no controle de <i>Anacanthorus penilabiatus</i> (Monogenea) em <i>Piaractus mesopotamicus</i>	59
---	-----------

RESUMO

60

ABSTRACT

61

1. INTRODUÇÃO

62

2. MATERIAL E MÉTODOS	64
-----------------------	----

2.1. Contagem inicial do número de monogenéticos, determinação da eficácia e condições ambientais	64
---	----

2.2. Eficácia do inseticida paration metílico no controle de <i>Anacanthorus penilabiatus</i>	65
2.3. Eficácia do EAFSN baseado na concentração de azadiractina no controle de <i>Anacanthorus penilabiatus</i>	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4. AGRADECIMENTOS	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
Capítulo 5. Determinação de resíduos de azadiractina do extrato aquoso de folhas secas de nim (<i>Azadirachta indica</i>) em peixes por cromatografia líquida de alta eficiência	79
RESUMO	80
ABSTRACT	81
1. INTRODUÇÃO	82
2. MATERIAIS E MÉTODOS	84
2.1. Reagentes	84
2.2. Delineamento experimental e coleta dos peixes após a exposição ao extrato aquoso de folhas secas de nim	84
2.3. Instrumentação	85
2.4. Condições Cromatográficas e preparação da curva analítica	85
2.5. Avaliação da recuperação da azadiractina dos peixes	85
2.6. Determinação do azadirachtin nos peixes	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	86
4. CONCLUSÃO	91
5. AGRADECIMENTOS	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
Capítulo 6. CONCLUSÕES GERAIS	96

RESUMO

Os objetivos desse trabalho foram determinar a concentração letal 50% (CL (I)_{50-96h}) do paration metílico e da azadiractina contida no extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*); avaliar a eficácia, concentrações seguras e o tempo de exposição do paration metílico e da azadiractina contida no EAFSN para o controle do *Anacanthorus penilabiatus*; avaliar as alterações nas brânquias e no fígado dos peixes expostos a concentrações subletais de paration metílico e a azadiractina; e determinar a presença resíduo de azadiractina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A CL (I)_{50-96h} calculada do paration metílico foi de 3,97 mg/L para os alevinos e de 9,89 mg/L para os jovens. Para a azadiractina contida no EAFSN foi de 1,20 mg/L para os alevinos e de 1,18 mg/L para os jovens. O paration metílico foi menos tóxico para os alevinos e jovens de pacu do que a azadiractina. Nas brânquias, o paration metílico causou congestão, fusão lamelar, edemas subepiteliais, hemorragias intersticiais, fusão lamelar e desorganização da estrutura lamelar e a azadiractina, edema subepitelial, fusão apical das lamelas secundárias. No fígado, o paration metílico causou congestão, fusão celular, hiperplasia dos hepatócitos e desarranjo da organização cordonal dos hepatócitos e a azadiractina, desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos, vacuolização citoplasmática, necrose das células epiteliais de revestimento dos canalículos biliares. O paration metílico foi mais eficiente que o EAFSN no controle dos parasitos monogenéticos, cujo controle foi proporcional ao aumento da concentração na água e ao tempo de exposição. A maior eficácia do paration metílico foi com 7 mg/L, que controlou 96,2 % dos parasitos às 16 horas de exposição e 97,0% às 24 e do EAFNS, com 2,9 mg/L de azadiractina, 89,2 % às 120 horas. Portanto, o paration metílico pode ser utilizado tanto na profilaxia quanto na terapêutica. O método analítico desenvolvido para a determinação da azadiractina é simples e rápido. A coluna ISRP-C₁₈ foi eficiente na quantificação de até 0,02 µg.L⁻¹. O tempo de retenção da azadiractina nesta coluna foi de 8,82 ± 0,04 min. Os alevinos de pacu bioconcentraram resíduos de azadiractina entre 0,17 e 0,62 µg.g⁻¹, após 96 horas de exposição.

SUMMARY

The objectives of the present study were 1) to determine the 50% lethal concentration (LC (I)_{50-96h}) of methyl parathion and azadirachtin present in the aqueous extract of dry neem leaves (AEDNL) for pacu (*Piaractus mesopotamicus*), 2) to evaluate the efficacy, safe concentrations and exposure time of methyl parathion and azadirachtin for the control of *Anacanthorus penilabiatus*, 3) to assess the alterations that occur in the gills and liver of fish exposed to sublethal concentrations of methyl parathion and azadirachtin, and 4) to determine the presence of azadirachtin residues in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) by high-performance liquid chromatography HPLC. The calculated LC (I)_{50-96h} of methyl parathion was 3.97 mg/L for fry pacu and 9.89 mg/L for juvenile fish. The LC (I)_{50-96h} of azadirachtin present in AEDNL was 1.20 and 1.18 mg/L for fry and juvenile fish, respectively. Methyl parathion was less toxic to fry and juvenile pacu than azadirachtin. In gills, methyl parathion caused congestion, lamellar fusion, subepithelial edema, interstitial hemorrhage, and disorganization of the lamellar structure, whereas azadirachtin caused subepithelial edema and apical fusion of secondary lamellae. In the liver, methyl parathion caused congestion, cell fusion, hepatocyte hyperplasia and derangement of the cord-like organization of hepatocytes, and azadirachtin caused disorganization of the cord-like arrangement of hepatocytes, cytoplasmic vacuolization, and necrosis of epithelial cells lining the bile canaliculi. Methyl parathion was more effective than the AEDNL in the control of monogenetic parasites, with this control being proportional to the increase of the insecticide's concentration in water and of exposure time. The highest efficacy of methyl parathion was observed at a concentration of 7 mg/L, with a 96.2% rate of parasite control after 16 h of exposure and a 97.0% rate after 24 h. For AEDNL, a concentration of 2.9 mg azadirachtin/L controlled 89.2% of the parasites after 120 h. These results indicate that methyl parathion can be used for both prophylactic and therapeutic purposes. The analytical method developed for the determination of azadirachtin is simple and rapid. The ISRP-C₁₈ column was efficient in quantifying up to 0.02 µg.L⁻¹. The retention time of azadirachtin on this column was 8.82 ± 0.04 min. Azadirachtin residues ranging from 0.17 to 0.62 µg.g⁻¹ were bioconcentrated in fry pacu after 96 h of exposure.

1. INTRODUÇÃO

O sucesso da aquicultura depende fundamentalmente dos ecossistemas nos quais está inserida, que devem permanecer equilibrados para possibilitar a manutenção da atividade (VALENTI, 2000). Os maiores problemas econômicos e ecológicos estão associados aos patógenos e parasitas que acompanham as espécies cultivadas. Estes organismos são importantes limitadores da produtividade, pois provocam atraso no crescimento dos peixes e altas taxas de mortalidade (RANZANI-PAIVA et al. 1997).

Dentre os principais parasitos de peixes, os monogenéticos estão entre os mais importantes para a piscicultura. São ectoparasitos do grupo dos platelmintos, caracterizados pela presença de aparelho de fixação localizado na parte posterior do corpo. Os adultos possuem forma alongada, ovoidal ou circular e medem de um milímetro a três centímetros. O prejuízo causado nos peixes está relacionado com a espécie do parasito, com o local da infestação, com o número de indivíduos encontrados nos peixes e com o tipo de alimentação que os parasitos realizam (PAVANELLI, 1998). O confinamento dos peixes em altas densidades, alimentação inadequada, alta concentração de matéria orgânica e baixo fluxo de água são fatores que contribuem para a reprodução deste parasito (MARTINS, 1998).

No Brasil, em levantamento da fauna parasitária realizado em 21 espécies de sete famílias de peixes foi constatada a ocorrência de monogenéticos em 63,1 % das amostras (KOHN et al. 1985). Em peixes de pisciculturas no município de Pindamonhangaba e Pariquera-Açu (SP), estes parasitos ocorreram em até 100 % dos *Piaractus mesopotamicus* (EIRAS et al. 1995). MARTINS e ROMERO (1996) citaram a ocorrência desses parasitos infestando 58 % dos peixes provenientes de pisciculturas. Em peixes de reservatórios na região nordeste do país, os monogenóides ocorreram, em média, em 16 % dos peixes (BEKÉSI, 1992).

A terapêutica de organismos de cultivos com substâncias tóxicas resulta na liberação de grandes quantidades de substâncias ativas e de seus metabólitos no ambiente aquático (KINKELIN et al. 1992). Para o controle de parasitos de peixes, alguns inseticidas organofosforados são empregados. A aplicação desses inseticidas pode resultar em altos níveis de resíduos nos peixes (RODRIGUES et al. 1997). Além disso, o uso excessivo e concentrações elevadas desses inseticidas podem resultar em mortalidade de peixes.

Na piscicultura, o paration metílico, inseticida do grupo químico dos organofosforados, é um dos mais empregados no controle de predadores aquáticos em tanques de produção e na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixe, com o objetivo de maximizar a produção de rotíferos (SENHORINI et al. 1991).

Entre os produtos que podem apresentar grande eficácia no controle de patógenos e resultar em menor impacto no meio ambiente está o pesticida natural azadiractina, isolado da planta Neem, *Azadirachta indica* (Meliaceae) (SCHAAF et al. 2000). Para VAN DER NAT et al. (1991) a azadiractina contida nesta planta pode ser utilizada para a fertilização do solo, repelir de insetos, inseticida, produto de higiene e na medicina. Segundo DEY (1980), na farmacologia, o nim apresenta efeitos antiinflamatórios, anti-reumáticos, anti-artrítico, antipirético e antimicrobial.

Os efeitos dos agrotóxicos sobre os organismos aquáticos podem ser estimados e monitorados por testes de toxicidade realizados em laboratório, utilizando sempre que possível organismo-teste presentes nas regiões sujeitas à ação destes contaminantes (RAND e PETROCELLI, 1985). Assim, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) pertencente à família Characidae e subfamília Serrasalminae, destaca-se como importante organismo para se realizar teste de avaliação de toxicidade dos agrotóxicos, pois é uma excelente espécie de cultivo. É uma espécie onívora, mas apresenta hábito alimentar frugívoro e herbívoro, do tipo podador e de caráter oportunista, rústica, precoce, com carne saborosa e de ótimo crescimento (SILVA, 1985). Por se tratar de uma espécie que aceita o arraçoamento, propicia sucesso na criação em sistemas de cultivos intensivos. Além das excelentes características para a aqüicultura, o pacu é hospedeiro natural de monogénéticos da espécie *Anacanthorus penilabiatu*s (BÖEGER, HUSACK e MARTINS, 1995; PAVANELLI et al. 1998).

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- 1- estimar a concentração letal CL (I) _(50-96h) do inseticida paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas nim (EAFSN), baseado na concentração de azadiractina, para alevinos e jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*);

- 2- avaliar a eficácia do inseticida paration metílico e da azadiractina contida EAFSN no controle do *Anacanthorus penilabiatus*;
- 3- determinar concentrações seguras e o tempo de exposição dos peixes durante o tratamento com paration metílico e com azadiractina contida no EAFSN para o controle do *Anacanthorus penilabiatus*;
- 4- avaliar as alterações subletais do paration metílico e azadiractina contida no EAFSN nas brânquias e no fígado dos alevinos e jovens de pacu;
- 5- determinar a presença resíduo de azadiractina contida no EAFSN, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A importância do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) para a aquicultura brasileira e ação dos parasitos monogenéticos

Entre os anos de 1960 e 1993 a produção brasileira de pescado passou de 281.512 para 697.577 toneladas (ABDALLAH e BACHA, 1998). Segundo a FAO

(1999), a produção brasileira de organismos aquáticos em cativeiro foi de 70.480 toneladas em 1997. Assim, com o avanço da piscicultura, principalmente na década de 80, começaram a surgir novas técnicas de criação e espécies nativas sendo cultivadas, como o pacu (*P. mesopotamicus*). O aumento necessário da produção de peixes depende de vários fatores, entre os quais se destaca a condição sanitária.

O cultivo de *Piaractus* sp. ocorre nos Estados do Acre, Amazonas, Rondônia e Roraima e o pacu, *P. mesopotamicus*, é cultivado no Maranhão, Piauí, Paraíba e Bahia, além de toda região Centro-Oeste, Sudeste e Sul (VALENTI, 2000).

Os monogenéticos foram escolhidos para o desenvolvimento deste trabalho devido a sua importância para produção de peixes constatada no levantamento realizado no Estado de São Paulo por TAVARES-DIAS (2000). Estes parasitos ocorreram em 20,6 % dos *P. mesopotamicus* e em 26,6 % dos *Leporinus macrocephalus* amostrados, além de representarem um dos principais problemas da piscicultura da região Norte e Nordeste desse Estado (MARTINS et al. 2000). Segundo WHITTINGTON (1998), no mundo, pode-se estimar que mais de 25000 espécies de peixes são parasitadas por monogenéticos.

As infecções causadas por helmintos são comuns em pisciculturas (WILLIAMS e JONES, 1994). Os monogenéticos são encontrados comumente na pele, nas brânquias ou nas narinas de peixes marinhos e de água doce (EIRAS, 1994). Esses parasitos pertencem à família Dactylogyridae, em que estão incluídos os espécimes ovíparos e a Gyrodactylidae, formada por indivíduos vivíparos (CHUBB, 1977; EIRAS, 1994). Em ciprinídeos as infecções por monogenéticos estão relacionadas à baixa qualidade da água e das condições sanitárias dos viveiros (FIGUEIRA e CECARELLI, 1991 e TOMEC et al. 1995). As infecções com alta carga parasitária de helmintos monogenéticos são indicadores de má qualidade da água devido à alta concentração de amônia ou nitrito, excesso de matéria orgânica ou baixa quantidade de oxigênio dissolvido. Nessas condições, os parasitos reproduzem-se rapidamente, podendo provocar surtos de mortalidade na criação (THATCHER e BRITES-NETO, 1994).

PAPERNA e KOHN (1964) verificaram que a elevada carga parasitária de *Trichodina domerguei* em carpas provocou infecção mais severa por monogenéticos. A associação entre dactilogirídeos e *Henneguya* sp. como causa de infecção branquial

aguda em *P. mesopotamicus* foi relatada por CECARELLI et al. (1993). Também foi descrita a infecção por monogenéticos associadas à *Trichodina* sp, causando alta mortalidade em alevinos de tilápia do Nilo (VARGAS et al. 1998).

No que se refere às alterações estruturais provocadas por monogenéticos, existem variações quanto à espécie do parasito, seu tipo de alimentação e local de fixação. Alguns se alimentam de células epiteliais e outros de sangue do hospedeiro (EIRAS, 1994). Os monogenéticos que parasitam as brânquias provocam hiperplasia do epitélio de revestimento, desprendimento do epitélio e ruptura de células pilares (MARTINS e ROMERO, 1996) e fusão das lamelas secundárias das brânquias (THATCHER, 1991).

O principal sinal da infecção por monogenéticos é a intensa produção de muco nas brânquias e superfície corporal dos peixes (EIRAS et al. 1995), anorexia, hemorragias cutâneas e branquiais, edema nos filamentos branquiais e perda de peso do animal (MARTINS, 1998). Existem relatos de ocorrência da infecção nos peixes *Osteoglossum bicirrosom* (KRITSKY e BÖEGER, 1983), *Anguilla anguilla* (CRUZ-SILVA et al. 1990/91), *Cyprinus carpio* (MOLNAR, 1994), *Salminus maxillosus* (BOEGER et al. 1995a), *Piaractus mesopotamicus* (BÖEGER et al. 1995b; MARTINS, 1998), *Salmo salar* (APPLEBY e MO, 1997) e em *Pimelodus maculatus* (GUTIERREZ e MARTORELLI, 1999).

3.2. Efeitos dos inseticidas organofosforados e da azadiractina nos organismos aquáticos

Os organofosforados atuam inibindo a ação da enzima acetil colinesterase, formando um complexo estável no sítio esterásico da enzima, impedindo a reação da acetilcolina com este sítio (LARINI, 1987). Para ABBAS e HAYTON (1997), em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), o paration metílico atuou na inibição da acetil colinesterase através da via de desulfuração oxidativa, formando o metabólito

paraoxon. A inibição da acetil colinesterase resulta no acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas.

Segundo JOHNSON et al. (1993), a análise histológica é um método rápido para se determinar os efeitos dos agentes químicos em tecidos e órgãos, pois ocorrem alterações na morfologia em resposta ao estresse subletal ou crônico.

Os órgãos de peixes mais afetados pelos agentes químicos são as brânquias e a pele, pois exibem grande superfície de contato e ambos apresentam células de muco, que possuem papel importante na resistência aos patógenos e as substâncias tóxicas (SHEPHARD, 1994). A seguir, os agentes químicos têm atuação sobre o fígado, que tem papel fundamental no metabolismo das substâncias tóxicas e sobre o rim, que atua na manutenção da estabilidade interna e na excreção (JOBLING e SUMPTER, 1993).

Os inseticidas organofosforados são utilizados na piscicultura de forma direta para o controle de odonatas, copépodes e monogenéticos (NOGA, 1996). O paration metílico é utilizado, no Brasil, em tanques de pisciculturas para eliminar larvas de insetos aquáticos predadores de larvas de peixes (SILVA et al. 1993).

Com relação aos efeitos dos organofosforados na morfologia dos organismos aquáticos, MURTY et al. (1984) descreveram que no *Mystus cavasius* o paration metílico causou deformidades nas células epiteliais do estômago e, na concentração de 15 ppm na água, provocou dano irreversível nas brânquias, diminuindo as trocas gasosas, induzindo o estresse e natação excitada.

Nos moluscos bivalves de água doce (*Anodonta californiensis*) e no marinho (*Mytilus californianus*) expostos ao paration ocorreram alterações branquiais, devido à modificação no balanço de poli fosfato inorgânico (SWINEHART e CHENEY, 1987).

Segundo RICHMONDS e DUTTA (1989), após vinte e quatro horas de exposição à dose de 0,05 mg/L de malation, outro inseticida pertencente ao grupo dos organofosforados, ocorreram algumas mudanças degenerativas na região interlamelar e no epitélio de revestimento das lamelas secundárias e necroses no filamento primário das brânquias do *Lepomis macrochirus*. Após setenta e duas e noventa e seis horas, os danos foram mais evidentes com o surgimento de necrose da lamela secundária e fusão das lamelas secundárias.

Após noventa e seis horas de exposição a 1,2 mg/L de malation foi constatada, no fígado do *Heteropneustes fossilis*, a diminuição no diâmetro celular, degeneração das membranas celulares, vacuolização no citoplasma e a fusão entre as células com o aparecimento de multinúcleos em várias regiões hepáticas (DUTTA et al. 1993).

O azinfós etil (Gusation A) inibiu a maturação gonadal, causou atrofia das células gametogênicas e ductos espermáticos e o desenvolvimento assincrônico da ovogênese e da espermatogênese em carpa (*Cyprinus carpio*) e em tilápia (*Oreochromis niloticus*) (HERRERA e RAMOS, 2001).

Com relação à azadiractina, esta apresenta vários efeitos sobre os organismos causando distúrbios no sistema hormonal, interrompendo o crescimento de insetos, inseticida, nematicida, fungicida, bactericida e imunoestimulante (KOLLIEN e SCHAUB, 1999).

Com relação ao nim, existem dados na literatura que indicam a presença de mais de 300 compostos químicos isolados das diferentes partes da planta de Neen True, a *Azadirachta indica* (GOVINDACHARI, 1992). Entre estes compostos, os limonóides (tetranotriterpenóides), formam o maior grupo (JONES et al. 1989). A planta *Azadirachta indica* é conhecida por suas propriedades medicinal e repelente de insetos. A azadiractina é um tetranotriterpenóide, que atua interrompendo a metamorfose dos insetos (SCHMUTTERER, 1990; BISWAS et al. 2002). ANON (1992) cita que a azadiractina proporcionou mais de 90 % de eficiência no controle de insetos. Além disso, exibiu baixa toxicidade aos organismos não-alvo, baixa persistência no meio ambiente e ação sistêmica (GILL e LEWIS, 1971).

3.3. Preparação e utilização de análises cromatográficas para a determinação de resíduos em peixes

Do ponto de vista analítico a preparação de amostras de tecidos de peixes é dificultada pela alta polaridade dos tecidos, devido à presença de lipídios, colesterol, ésteres, mono e triglicérides e fosfolipídios (HERNANDEZ et al. 1998). Estes compostos dificultam a extração dos resíduos e a purificação das amostras. Outro problema analítico está no grande volume de solvente utilizado, baixa recuperação de alguns compostos e o longo tempo de extração e análise (DANIS et al. 2002). Estes

fatores têm contribuído para o desenvolvimento de métodos especializados para o grupo dos pesticidas em matrizes de origem aquática como água, sedimento, algas, zooplâncton e peixes.

Assim, ALLENDER (1991) estudou a extração de clorpirifos em *Cyprinus carpio* e *Perca fluviatilis*, misturando 3 g de peixe, com 3 g de fosfato disódico, 3 g de fosfato de potássio e 15 g de sulfato sódio anidro. A purificação foi realizada em coluna pré-preparada com 2 g de sulfato de sódio granulado e 3,5 g de sílica gel desativada. A recuperação do clorpirifos foi de 83,4 a 91,2 %, com a utilização de detector de captura de elétrons em cromatografia gasosa.

BEGUM et al. (1994) estudaram a bioacumulação de dimetoato em fígado e músculo de *Clarias batrachus*, onde foram misturados 2 g de tecido com 4 g de sulfato de sódio anidro. A esta mistura foi adicionado 60 mL de cloreto de metileno e agitação por 5 minutos. O extrato foi filtrado e novamente adicionou-se cloreto de metileno, que foi evaporado em rotaevaporador. Após este procedimento, foi adicionado *n*-hexano e acetonitrila (1:1 v/v) ao resíduo e agitação mecânica por 30 minutos. A mistura foi transferida para um funil de separação e a fase de acetonitrila foi coletada. O resíduo obtido depois da evaporação do acetonitrila foi dissolvido em 0,5 mL de acetona e injetado no cromatógrafo à gás.

Segundo ABBAS e HAYTON (1996), a preparação de amostras de tecido de peixes (cérebro, coração, músculo branco, fígado, rim e plasma) para a quantificação cromatográfica dos resíduos de paration e paraoxon pode ser realizada por meio dos seguintes procedimentos: amostra de tecido extraída com 3 mL de isooctano com 200 µL de metanol e cloreto de sódio concentrado para desnaturação das proteínas. Centrifugação do extrato por 3 minutos a 5 °C a 3000 rpm. Coleta e evaporação do sobrenadante. Reconstituição do resíduo em 0,1 e 1,0 mL de isooctano e injeção de alíquotas de 1,0 µL no cromatógrafo à gás.

HERNANDEZ et al. (1998) realizaram análises de resíduos de inseticidas organofosforados em diferentes tipos de organismos aquáticos marinhos (*Skeletonema costatum*, *Artemia salina*, *Aphanius iberus* e *Gambusia affinis*). Para tanto, liofilizaram 2 g de tecido que foi homogeneizado com 30 g de sulfato de sódio anidro e 1 g de celito. A extração foi realizada com 150 mL de acetonitrila:acetona (90:10; v/v) em alta

velocidade em ultra-turrax, durante 3 minutos. A seguir, a solução foi filtrada, pré-concentrada e o resíduo final foi dissolvido em 2 mL *n*-hexano e injetado no cromatógrafo à gás.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também é utilizada para a análise de resíduo de substâncias tóxicas em amostras dos componentes do ambiente aquático e em análises de resíduos de compostos utilizados para o tratamento de parasitos, ou em casos de poluição aquática.

TAKINO et al. (2003) determinaram resíduos de cloranfenicol em amostras de 5 g de peixes, misturadas com 10 mL de acetato de etila e 5 g de sulfato de sódio anidro. A mistura foi homogeneizada em ultra-turrax por 20 segundos e centrifugada por 5 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante foi transferido para balão de fundo redondo, adicionado de 10 mL de acetato de etila e evaporado em rotaevaporador a 40 °C. Após este procedimento, foi adicionado ao resíduo 1 mL de acetonitrila e 1 mL de *n*-hexano. A fase do *n*-hexano foi descartada e a de acetonitrila evaporada. O resíduo seco foi dissolvido em 0,5 mL de acetonitrila-água (10:90), contendo 10 mM acetato de amônio.

BERGWERFF et al. (2004) utilizaram a CLAE para analisar resíduos de verde malaquita em *Anguilla anguilla*. Para a extração moeram 2 g de tecido em micro turrax na presença de 2 mL de tampão McIlvaine pH 3,0. A seguir, adicionaram 12 mL de acetonitrila e centrifugação da suspensão. O sobrenadante foi coletado e o material particulado extraído novamente com 2 mL de tampão McIlvaine pH 6,0 e 12 mL de acetonitrila, com agitação por 10 minutos a 500 rpm. Após este procedimento, foi realizada a centrifugação e os sobrenadantes foram combinados com adição de 6 mL de diclorometano.

A CLAE também foi utilizada por HAUG e HALS (2000), para determinação de oxitetraciclina em *Salvelinus alpinus*, por INGELSE et al. (2001), para organofosforado em amostras de água por injeção direta e por DAWSON et al. (2003), para cloramina T em *Oncorhynchus mykiss*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, R. e HAYTON, W.L. Gas chromatographic determination of parathion e paraoxon in fish plasma and tissues. **J. Analyt. Toxicol**, Niles, v. 20, p.151-154, 1996.

ABBAS, R. e HAYTON, W.L. A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for paraoxon in Rainbow trout. **Toxicol. Applied Pharmacol**, San Diego, v. 145, p. 192-201, 1997.

ABDALLAH, P.R. BACHA, C.J.C. Evolução da atividade pesqueira no Brasil: 1960-1994. *In*: AGUIAR, D.R.D. e PINHO, J.B. (Eds.). **O agronegócio brasileiro: desafios e perspectivas**. SOBER, Brasília-DF, v. 2, 1998.2188p.

ALLENDER, W.J. Column extraction of chlorpyrifos from contaminated fish. **J. Analy. Toxicol**, Niles, v. 15, p. 141-143, 1991.

ANON. **Neem a true for solving global problems.** National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 1992.

APPLEBY, C. e MO, T.A. Populations dynamics of *Gyrodactylus derjavini* (Monogenea) infecting Atlantic salmon, *Salmo salar* parr in the River Batnfjorselva. **J. Parasitol**, Lawrence, v. 83, n. 3, p. 23-30. 1997.

BEGUM, G. VIJAYARAGHAVAN, S. NAGESWARA SARMA, P. HUSAIN, S. Study of dimeothoate bioaccumulation in liver and tissues of *Clarias batrachus* and its elimination following cessation of exposure. **Pestic. Sci**, Oxford, v. 40, p. 201-205, 1994.

BEKÉSI, L. Evakuation of data on ichthyopathologicalanalyses in the Brazilian northeast. **Cienc. Cult**, São Paulo, v. 44, n. 6, 400-403, 1992.

BERGWERFF, A.A. KUIPER, R.V. SCHERPENISSE, P. Persistence of residues of malaquite green in juvenile eels (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, New York, v. 233, n. 1-4, 2004.

BISWAS, K. CHATTOPADHYAY, BANERJEE, R.K. BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Curr. Scienc**, Bangalore. v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002.

BÖEGER, W.A. DOMINGUES, M. PAVANELLI, G.C. Neotropical monogenoidea. 24. *Rhinoxenus bulbovaginatus* (Dactylogyridae) from the nasal cavity of *Salminus maxillosus* from de Rio Paraná, Paraná, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**, Rio de janeiro, v. 90. n. 6. p. 695-698, 1995a.

BÖEGER, W.A. HUSACK, W.S. MARTINS, M.L. Neotropical monogenoidea. 25. *Anacanthorus penilabiatus* (Dactylogyridea: Anacanthirinae) from *Piaractus mesopotamicus*, cultivated in the State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**, Rio de janeiro, v. 90. n. 6. p. 699-701, 1995b.

CECARELLI, P.S. ALCANTARA-ROCHA, R.C.G. MELO, J.S.C. Efeito do formaldeído sobre a *Trichodina* sp e *Linguadactyloides* sp em alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Bol. Tec. CEPTA**, Pirassunga, v. 6, n. 2, p. 23-30, 1993.

CHUBB, J. Seasonal occurrence of helminths in freshwater fishes. Part I. Monogenea. **Parasitology**, Riverdale, v. 15, p. 133-198, 1977.

CRUZ-SILVA, M.P. CARVALHO-VARELLA, M. CARVALHO, S.P. GRAZINA-FREITAS, S. Parasitas e parasitoses dos animais aquáticos em estuario e maricultura em Portugal. **Anais Fac. Medic. Vet**, Lisboa. v. 27/28, p. 223-236, 1990/91.

DANIS, T. SAKKAS, V. STRATIS, I. ALBANIS, T.A. Pesticide multiresidue analysis in fresh and canned peaches using solid phase extraction and gas chromatography techniques. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, v. 69, p. 674-681, 2002.

DAWSON, V.K. MEINERTZ, J.R. SCHMIDT, L.J. GINGERICH, W.H. A simple analytical procedure to replace HPLC for monitoring treatment concentrations of chloramine –T on fish cultures facilities. **Aquaculture**, New York, v. 217, p. 61-72, 2003.

DEY, A.C. **Indian medical plants used in Ayurvedic preparations**. Bishen, p. 165-166, 1980.

DUTTA, H.M. ADHIKARI, S. SINGH, N.K. ROY, P.K. MUNSHI, J.S.D. Histopathological changes induced by Malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Bull. Env. Contam. Toxicol**, New York, v. 51, p. 895-900, 1993.

EIRAS, J.C. **Elementos de Ictioparasitologia**. Porto, Ed. Fundação Antonio de Almeida, 1994, 339p.

EIRAS, J.C. RANZANI-PAIVA, M.J.T. ISHIKAWA, C.M. ALEXADRINO, A.C. EIRAS, A.C. Ectoparasites of semi-intensively farmed tropical freshwater fish *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* and *Colossoma macropomum* in Brazil. **Bull Eur. Ass. Fish. Pathol**, Porto, v. 15, n. 5, p. 148-151, 1995.

FAO. **AQUICULTURE PRODUCTION STATISTICS 1988-1997**. FAO Fisheries Circular n.815, Revision 11. FAO, Roma, p.203, 1999.

FIGUEIRA, L.B. e CECARELLI, P.S. Observações sobre a presença de ectoparasitas em pisciculturas tropicais de interior (CEPTA e região). **Bol. Tec. CEPTA**, Pirassununga, v. 4, n. 1, p. 57-65, 1991.

GILL, J.S. e LEWIS, C.T. Systemic action of an insect feeding deterrent. **Nature**, London, v. 232, p. 402-403, 1971.

GOVINDACHARI, T.R. Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (the neem tree). **Curr. Scienc**, Bangalore, v. 63, n. 3, p.117-122, 1992.

GUTIERREZ, P.A. e MARTORELLI, S.R.. The structure of the monogean community on the gills of *Pimelodus maculatus* in Rio de la Plata. **Parasitology**, Riverdale, v. 119, p. 177-182, 1999.

HAUG, T. e HALS, P.A. Pharmacokinetics of oxitetracycline of arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in freshwater at low temperature. **Aquaculture**, New York, v. 186, p. 175-191, 2000.

HERNANDEZ, F. SERRANO, R. PITARCH, E. LOPEZ, F.J. Automated sample clean-up procedure for organophosphorus pesticides in several aquatic organisms using normal phase liquid chromatography. **Analy. Chim. Acta**, San Diego, v. 374, p. 215-229, 1998.

HERRERA, A.A. e RAMOS, G.B. Comparative histopathology of the reproductive of maturing *Cyprinus carpio* and *Oreochromis niloticus* exposed to Azinphosethyl. **Asia. Life. Scien**, Tambovka, v. 10, n. 2, p. 69-81, 2001.

INGELSE, B.A. VAM DAM, R.C.J. VREEKEN, R.J. MOL, H.G.J. STEIJGER, O.M. Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous sample by direct injection using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromat. A**, Amsterdam, v. 918, p. 67-78, 2001.

JOBLING, S. e SUMPTER, J.P. Detergent components in seware effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using raimbow tout *Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic. Toxicol**, Amsterdam, v. 27, p. 361-372, 1993.

JOHNSON, L.L. STEHR, C.M. OLSON, O.P. MYERS, M.S. PIERCE, S.M. WIGREN, C.A. McCAIN, B.B. VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Environ. Scienc. Technol**, Easton, v. 27, p. 2759-2771, 1993.

JONES, S.V, LEY, E.D. MORGAN, D. In: JACOBSON (Ed). **Focus on phytochemical pesticides, the neem tree**. v. 1, Boca Raton, CRC Press, 1989, 19p.

KINKELIN, P. MICHEL, C. GHITTINO, P. **Tratado de las enfermedades de los peces**. ed. Acribia, Zaragoza, 1992, 353p.

KOLLIEN, A.K. e SCHAUB, G.A. The effect of azadirachtin on *Blastocrithidia triatomae* and *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* (Insecta, Hemiptera). **Intern. J. Parasitol.** Oxford, v. 29, p. 403-414, 1999.

KRITSKY, D.C. e BOEGER, W.A. Neotropical monogenea. Five new species from the aruanã *Osteoglossum bicirrosus*, a freshwater teleost from the Brazil, with proposal of *Gonocleithrum* n. gen. (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae). **Proc. Biol. Soc. Wash**, Edinburgh, v. 96, p. 581-597, 1983.

KOHN, A. FERNANDES, B.M.M. MACEDO, B. ABRAMSON, B. Helminths parasites of freshwater fishes from Pirassununga, SP. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 80, n.3, p. 327-336, 1985.

LARINI, L. **Toxicologia**. Editora: Manole. São Paulo, 1987. 315p.

MARTINS, M.L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* on the infra populations of *Anacanthorus penilabiatus* (monogenea). **Braz. J. Med. Biol. Res**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 655-658, 1998.

MARTINS, M.L. e ROMERO, N.G. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial em peces cultivados: estudo parasitologico e histopatologico. **Rev. Bras. Zool**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 489-500, 1996.

MARTINS, M.L. MORAES, F.R. FUJIMOTO, R.Y. ONAKA, E.M. NOMURA, D.T. SILVA, C.A.H. SCHALCH, S.H.C. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes. A survey of diagnosticated cases from 1993 to 1998. **Rev. Bras. Parasit**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 23-28, 2000.

MOLNAR, K. Effect of decreased water oxygen content on common carp fry with *Dactylogyrus vastator* (Monogenea) infection of varying severity. **Dis. Aquat. Org**, Oldendorf, v. 20, p. 153-157, 1994.

MURTY, A.S. RAMANI, A.V. CHRISTOPHER, K. RAJABHUSHASNAM, B.R. Toxicity of methyl parathion and fensulfothion to the fish *Mystus cavasius*. **Environ. Pollut. (Series A)**, Massachusetts, v. 34, n. 1, p. 37-46, 1984.

NOGA, E.J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. Mosby, North Carolina State University, College of Veterinary Medicine, St. Louis, 1996, 367p.

PAPERNA, I. e KOHN, A. Studies on the host-parasite relations between carps and populations of protozoa and monogenetic trematoids in mixed infestations. **Rev. Brasil. Biol**, São Carlos, v. 24, n. 3, p. 269-276, 1964.

PAVANELLI, G.C. EIRAS, J.C. TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Ed. EDUEM, Maringá, 1998, 264p.

RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington, 1985. 665p.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. ISHIKAWA, C.M. CAMPOS, B.E.S. EIRAS, A.C. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo. **Brazil. Rev. Bras. Zool**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 329-339, 1997.

RICHMONDS, C. e DUTTA, H.M. Histopathological changes induced by Malathion in gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. **Bull. Env. Contam. Toxicol**, New York, v. 43, p. 123-130, 1989.

RODRIGUES, E.L. RANZANI-PAIVA, M.J. PACHECO, F.J. VEIGA, M.L. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **Bol. Tec. CEPTA**, Pirassununga, p. 197-203, 1997.

SCHAAF, O. JARVIS, A. P. ESCH, A.V.D. GIAGNACOVO, G. OLDHAM, N.J. Rapid and sensitive analysis of azadachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **J. Chromat. A**. Amsterdam, v. 886, p. 89-97, 2000.

SCHMUTTERER, H. Properties and potencial of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Ann. Rev. Entomol**, Stanford, v. 35, p. 271-297, 1990.

SENHORINI, J.A. FONTES, N.A. LUCAS, A.F.B. SANTOS JR.S. Larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Pisces, Characidae) em viveiros com e sem organofosforado (folidol 60%). **Bol. Tec. CEPTA**, Pirassununga, n. 2, p. 11-22, 1991.

SHEPHARD, K.L. **Functions for fish mucus. Review in fish biology and fisheries**. Siebeck, v. 4, p. 401-429, 1994.

SILVA, A.J. **Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895) (Pisces, Characidae) no pantanal de Mato Grosso**. Dissertação (Mestrado-Zoologia), UFRJ. Rio de Janeiro, 1985. 92p.

SILVA, H.C. MEDINA, H.S.G. FANTA, E. BACILA, M. Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Telestei). **Comp. Biochem. Physiol**, Oxford, v. 105c n. 2. p. 197-201, 1993.

SWINEHART, J.H. CHENEY, M.A. Interactions of organic pollutants with gills of the bivalve molluscs *Anodonta californiensis* and *Mytilus californianus*: Uptake and effect on membrane fluxes. **Comp. Biochem. Physiol**, Oxford, v. 88c, n. 2, p. 293-299, 1987.

TAKINO, M. DAISHIMA, S. NAKAHARA, T. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. **J. Chromat. A**. Amsterdam, v. 1011, p. 67-75, 2003.

TAVARES-DIAS, M. **Estudos parasitológico e hematológico em peixes oriundos de "pesque-pagues" do município de Franca, São Paulo**. Dissertação (Mestrado-Aqüicultura), CAUNESP, Jaboticabal, 2000, 130p.

THATCHER, V.E. **Amazon fish parasites**. Amazon. Manaus, v. 11, n. 3/4, 263-572, 1991.

THATCHER, V.E. e BRITES-NETO, J. Diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. **Rev. Bras. Med. Vet.** Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 111-128, 1994.

TOMEČ, M. HACMANJEK, M. TESKEREDZIC, Z. TESKEREDZIC, E. COZRAKOVAC, R. Kvaliteta vode i ektoparazitarne bolesti ciprinidnih riba. **Ribarstvo**. Split, v. 53, n. 4, p.129-139, 1995.

VALENTI, W. C. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. CNPq/ Ministério da Ciência e tecnologia. Brasília-DF, 2000, 399p.

VAN DER NAT, J.M. VAN DER SLUIS, W.G. SILVA, K.T.D. LABADIE, R.P. Ethnopharmacognostical survey of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). **J. Ethnopharm**, Lausanne, v. 35, p. 1-24, 1991.

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

WILLIAMS, H.H. e JONES, A. **Parasitic worms of fish**. Ed. Taylor and Francis, London. 593p. 1994.

WHITTINGTON, I.D. Diversity down under: monogeneans in the antipodes Austrália with a prediction of monogenean biodiversity world-wide. **Intern. J. Parasitol**, Oxford, v. 28, p. 1481-1493, 1998.

Referências bibliográficas segundo a norma da ABNT NBR-6023.

Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) para alevino e jovem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)*

CRUZ, C¹. MACHADO-NETO, J.G². MENEZES, M.L.³

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal.
Departamento de Fitossanidade.

Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14870-000

Jaboticabal, São Paulo.

E-mail: joaquim@fcav.unesp.br

*Artigo formatado segundo a norma da revista científica Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio ambiente. (ISSN: 0103-7277).

Enviado para a publicação: 21/07/2004, revisado em 26/10/2004, publicado em dezembro de 2004.

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram estimar a CL (I)_{50-96h} do paration metílico e do em extratos aquosos de folhas secas de nim (EAFSN) para alevino e jovens de pacu (*P. mesopotamicus*) e o efeito do peso corpóreo na toxicidade aguda. Determinar as concentrações não letais para serem utilizadas como referências iniciais em estudos de eficácia no controle de parasitos e classificar o risco ambiental do uso do paration metílico e do nim para o controle de parasitas e patógenos de pacu. Foram realizados dois experimentos, em condições laboratoriais, para a determinação da concentração letal (CL (I)_{50-96h}). A CL (I)_{50-96h} calculada do paration metílico foi de 3,97 mg/L para os alevinos e de 9,89 mg/L para os jovens. Para a azadiractina presente no EAFSN foi de 1,20 mg/L para os alevinos e de 1,18 mg/L para os jovens. A concentração de 1,0 mg/L de paration metílico para os alevinos e de 7,5 mg/L para os jovens e as de 0,29 e 0,59 mg/L de azadiractina não provocaram mortalidade nos animais expostos e podem ser utilizadas como referências em estudos de controle de parasitos em pacu. O paration metílico foi menos tóxico para os alevinos e para os jovens de pacu do que o extrato aquoso de nim, indicando a necessidade de cuidados com a utilização de EAFSN no ambiente aquático.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*, paration metílico, azadiractina, toxicidade aguda.

1. INTRODUÇÃO

A avaliação ecotoxicológica é importante para o controle, regulamentação e classificação de novas substâncias tóxicas quanto ao potencial de risco ambiental. A identificação do perigo e a avaliação da relação dose resposta são etapas iniciais no processo de avaliação da toxicidade ou de risco ambiental (USEPA, 2002). Nos últimos anos, aumentou o interesse sobre os efeitos que as substâncias tóxicas provocam na saúde dos peixes, devido ao desenvolvimento de pisciculturas em regiões onde são realizadas atividades industriais ou agrícolas. Estas atividades podem gerar resíduos que ao atingirem as bacias hidrográficas expõem os peixes a altas concentrações de substâncias tóxicas (PARMA de CROUX et al. 2002).

Os inseticidas organofosforados são utilizados, de modo geral, na piscicultura em aplicação direta na água para o controle de odonatas, copépodes e monogenéticos (NOGA, 1996). O paration metílico, inseticida que pertence a este grupo químico, é utilizado, no Brasil, em tanques de pisciculturas para controlar larvas de insetos aquáticos predadores de larvas de peixes (SILVA et al. 1993). É um dos inseticidas mais empregados para o controle de predadores aquáticos em tanques de produção e na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixe, para maximizar a produção de rotíferos (SENHORINI et al. 1991). A aplicação destes inseticidas pode provocar efeitos tóxicos agudos nos peixes e resultar em altos riscos de intoxicação (RODRIGUES et al. 1997).

Assim, o estudo da toxicidade aguda auxilia na avaliação do risco ambiental devido à utilização dessas substâncias e na determinação de concentrações seguras para o controle de parasitos em pisciculturas, visando à diminuição do impacto ambiental negativo e sobre os peixes. Estudos sobre a toxicidade aguda (CL (I) 50-96h) de inseticidas organofosforados nos organismos aquáticos foram realizados com gusation A em *Penaeus monodon* (BATICADOS e TENDENCIA 1991); com paration metílico em *Daphnia magna* (CASALDERREY et al. 1994); com parathion em *Ankistrodesmus falcatus*, *Moina macrocopa* e *Oreochromis hornorum* (MARTINEZ-TABCHE et al. 1994); em *Gambusia affinis* e *Notropis ludibundis* (WALTON et al. 1997); com clorpirifós, paration e paration metílico em *Gambusia affinis* (BOONE e CHAMBERS 1996); com clorpirifós, fenubucarb, monocrotofós e paration metílico em *Oreochromis mossambicus* por (CALUMPANG et al. 1997); em larvas, pós-larvas e adultos de *Homarus americanus* com azametifós (BURRIDGE et al. 1999); e com monocrotofós em *Prochilodus lineatus* (PARMA de CROUX et al. 2002).

Na tentativa de encontrar produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais para minimizar os efeitos causados pela alta toxicidade dos agrotóxicos no ambiente aquático, a planta de nim pode ser utilizada. O principal princípio ativo do nim é a azadiractina, com estrutura química $C_{35}H_{44}O_{16}$, polar e altamente oxigenado, pertencente ao grupo dos limonóides, pode ser testado como uma alternativa menos impactante que os inseticidas organofosforados. O nim apresenta grande eficiência no controle de patógenos e pode resultar em menor impacto ao ambiente aquático. Segundo SCHAAFF et al. (2000) e GOVINDACHARI (1992) existem mais de 300 compostos químicos isolados das diferentes partes da planta de nim.

A azadiractina da planta de nim pode ser utilizada como repelente de insetos, inseticida, produto de higiene e na medicina VAN DER NAT et al. (1991). Estudos de toxicidade aguda da azadiractina em organismos aquáticos foram realizados em *Daphnia pulex* (GOKTEPE e PLHAK, 2002), em seis espécies de macro invertebrados aquáticos (DUNKEL e RICILARDS, 1998), em jovem de salmão do pacífico (*Onchorhynchus tshawytscha* e *O. kisutchi*), em truta (*O. mykiss*) (WAN et al. 1996) e em molusco *Lymnea acuminata* (SINGH et al. 1996).

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (Characidae: Serrasalminae, Holmberg, 1887), uma espécie endêmica da bacia do Paraná-Paraguai com importância comercial e um dos peixes mais cultivado na região neotropical (SAINT-PAUL, 1986). É um peixe onívoro, rústico, precoce, com carne saborosa, ótima taxa de crescimento e destaca-se como excelente para o cultivo em sistemas intensivos (SILVA, 1985). Por estas razões e por ser espécie autóctone, o pacu destaca-se como espécie importante para ser utilizada como organismo-teste em estudos de toxicidade aguda de agrotóxicos de acordo com o IBAMA (1987) e da CETESB (1999). Nestas normas recomenda-se a utilização de espécies de peixes pertencentes à família Characidae. Os objetivos deste trabalho foram: 1) estimar a (CL (I)_{50-96h}) do inseticida organofosforado paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN) baseado na concentração de azadiractina para alevinos e jovens de *P. mesopotamicus*; 2) avaliar o efeito do peso corpóreo dos peixes sobre a toxicidade aguda do paration metílico e do nim para o pacu; e 3) avaliar o risco ambiental do uso de paration metílico e do nim para o controle de parasitos e patógenos de pacu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os peixes utilizados neste trabalho foram provenientes do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

2.1. Testes preliminares e de controle de sensibilidade dos organismos-teste

Os testes preliminares com paration metílico e com o EAFSN baseado na concentração de azadiractina foram realizados com a utilização de quatro concentrações crescentes e um tratamento, controle com três repetições (RAND e PETROCELLI, 1985).

Para o controle de sensibilidade dos organismos-teste foram realizados periodicamente testes de toxicidade aguda com 24 horas de duração, utilizando como substâncias referências o dicromato de potássio e cloreto de sódio. Foram utilizadas

ambas as substâncias com teores de pureza de 99,9 %, de acordo com a metodologia recomendada pelo IBAMA (1987).

Nos testes preliminares de toxicidade aguda foram determinados os intervalos de concentração de paration metílico e de EAFSN que causaram zero e 100 % de mortalidade, para serem utilizadas nos testes definitivos, segundo as metodologias recomendada pela APHA (1991) e pelo IBAMA (1987).

Os testes foram conduzidos por 96 horas em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água durante o período de exposição dos peixes. Os animais foram mantidos sem alimentação. A água utilizada nos testes foi da rede de abastecimento local, proveniente de um poço semi-artesiano. A avaliação da mortalidade foi diária com a retirada dos peixes mortos dos recipientes. Diariamente foram determinados de cada recipiente os dados de temperatura, pH, amônia, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água (Tab. 1).

As condições ambientais foram mantidas segundo a metodologia recomendada pelo IBAMA (1987), exceto a temperatura da sala de ensaio que foi mantida entre 27 e 28 °C para melhor conforto térmico dos animais segundo SILVA (1985) (Tab. 1).

Os valores de (CL (I) _{50-96h}) foram estimados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al. 1977).

Tabela 1. Condições ambientais e variáveis da água durante os testes de toxicidade aguda do paration metílico e do nim para *Piaractus mesopotamicus*.

	Temperatura da Sala de Ensaio (°C)	Temperatura da água (°C)	pH	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Condutividade (mS/cm)	Amônia (µg/L)
paration metílico	28 ± 0,5	26 ± 0,5	7,20 - 7,40	8,90 - 9,00	0,165	128
azadiractina	27 ± 07	26,5 ± 0,5	7,20 - 7,45	7,15 – 7,67	0,178	156
dicromato de potássio P.A.	27 ± 1,0	25,5 ± 1,0	7,15 – 7,40	7,83 – 7,90	0,195	145
cloreto de sódio P.A.	28 ± 0,5	26,5 ± 1,0	7,00 – 7,49	8,10 – 8,30	0,450	178

2.2. Determinação da toxicidade aguda (CL (I) _{50-96h}) do paration metílico

Para a determinação da toxicidade aguda do foram utilizados dois grupos de peixes: alevinos com peso entre 1 e 2 g e jovens com peso entre 50 e 70 g. Em todos

os ensaios foi mantida a densidade máxima de 1 g de massa animal/L de água conforme a metodologia da APHA (1991) e CETESB (1999).

Os peixes foram previamente aclimatados na sala de bioensaios por dez dias, de acordo com as recomendações do IBAMA (1987) e MURTY (1988). A aclimatação foi realizada em uma caixa de cimento amianto de 250 L, com sistema de aeração contínuo promovido por bombas de ar. Neste período os animais foram alimentados *ad libitum* com ração comercial uma vez ao dia.

Os alevinos de pacu foram expostos às concentrações crescentes de: 0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 mg de paration metílico/L de água, com quatro repetições e cinco peixes por repetição. Os animais jovens foram expostos às concentrações de: 0; 7,5; 9,0; 10,5; 12; 13,5 e 15 mg de paration metílico/L de água, com quatro repetições e cinco peixes por repetição.

2.3. Determinação da azadiractina contida no EAFSN

Para a determinação da azadiractina presente nas folhas de nim foi preparada uma suspensão contendo 10 g de folhas secas e moídas de *Azadirachta indica* por litro de água. A seguir, foi realizada a homogeneização da suspensão com auxílio de bastão de vidro, que permaneceu em repouso por 24 horas. Após este período, a suspensão foi filtrada em papel de filtro comum. A concentração de azadiractina presente no filtrado de EAFSN foi determinada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado um cromatógrafo da marca Varian Modelo 2510, equipado com bomba recíproca, com detector de ultravioleta de comprimento de onda variável marca Varian modelo 2550, com comprimento de onda ajustado em 217 nm e um integrador SP 4400 Chromajet (Varian Associates, Inc: Sunnyvale, CA, USA). A coluna cromatográfica empregada foi a de superfície interna de fase reserva ISRP-C₁₈ (250 mm x 2 mm D.I.) preparada conforme MENEZES e FÉLIX (1998). A determinação da azadiractina foi realizada em temperatura ambiente, com fluxo de fase móvel ajustado em 0,5 a mL/minuto. A fase móvel utilizada foi composta por uma mistura de solução aquosa de fosfato monobásico de sódio 0,05 mol/L e acetonitrila (63:37; v/v). A quantificação foi efetuada com padrão externo, com curva de calibração contendo 15,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; e 60,0 µg de azadiractina/L de metanol segundo as metodologias de SUNDARAM

e CURRY (1993) e MENEZES et al. (2000). O padrão analítico de azadiractina utilizado do da marca SIGMA[®].

2.4. Determinação da toxicidade aguda (CL (I)_{50-96h}) do EAFSN baseado na concentração de azadiractina

Para os testes de toxicidade aguda para o EAFSN foram utilizados alevinos de pacu com peso entre 1 e 2 g e jovens entre 50 e 70 g. Em todos os ensaios foi mantida a densidade máxima de 1 g/L de água conforme a metodologia da APHA (1991) e CETESB (1999).

Os animais foram expostos às concentrações crescentes de 0,0; 25; 50; 75; 100; 125; e 150 mL de extrato aquoso de nim/L de água que equivale às concentrações de 0,0; 0,29; 0,59; 0,88; 1,18; 1,47 e 1,77 mg de azadiractina/L de água. Os experimentos foram realizados com as mesmas concentrações para os dois grupos de peixes, pois nos testes preliminares não foi possível o aumento de concentração com o aumento de peso dos animais. O sistema de condução do teste foi o estático com o período de exposição de 96 horas, sem alimentação dos peixes. A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente com a retirada dos indivíduos mortos dos recipientes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Paration metílico

A equação linear que representa a relação concentração-resposta do paration metílico estimada para os alevinos e para os jovens de *P. mesopotamicus* estão apresentadas na Tabela 2. A CL (I)_{50-96h} para os alevinos foi de 3,97 mg/L e para os jovens foi de 9,89 mg/L.

O aumento de 2,5 vezes no valor da CL (I) $_{50-96h}$ calculada para os jovens em relação ao valor estimado para os alevinos pode ser atribuída à diferença de sensibilidade ao agrotóxico que os animais apresentam em diferentes fases da vida e ao maior desenvolvimento do sistema enzimático de destoxificação no fígado dos animais jovens (MOTOYAMA et al. 1991). De forma geral, LARINI (1987) e HAYES e LAWS (1991) citam que a toxicidade aguda de um composto químico é expressa em mg/kg. Portanto, esperava-se que seria necessário aumento na concentração do paration metílico na água para se obter a CL (I) $_{50-96h}$ dos animais com peso entre 50 e 70 g. Por outro lado, BURRIDGE et al. (1999) verificaram que a larva de lagosta (*Homarus americanus*) é mais tolerante ao azametifós, com CL $_{(50-48h)}$ de 3,57 $\mu\text{g/L}$, enquanto que para o adulto foi de 1,39 $\mu\text{g/L}$. Da mesma forma, resultados semelhantes aos de BURRIDGE et al. (1999) foram obtidos por ANGUIANO et al. (1994), para embriões e larvas de *Bufo arenarum* expostas ao inseticida paration. Porém, o *P. mesopotamicus* com peso entre 1 e 2 g, considerado alevino, foi mais sensível ao paration metílico do que os animais com peso entre 50 e 70 g (Tabela. 2).

O paration metílico foi menos tóxico para o pacu nos estádios alevino e jovem do que os inseticidas clorpirifós e paration para o peixe mosquito (*Gambusia affinis*), que apresentaram concentrações letais 50% de 0,15 e 0,35 mg/L, respectivamente (BOONE e CHAMBERS, 1996) e do paration para os peixes *G. affinis* e *N. ludibundis* que foi de 3517 $\mu\text{g/L}$ e 2041 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (WALTON et al. 1997). Em relação a outros organismos aquáticos, o paration metílico também foi menos tóxico para o pacu. Para o camarão tigre (*Penaeus monodon*), a CL $_{50 - 48h}$ foi de 120 $\mu\text{g/L}$ (BATICADOS e TENDENCIA, 1991); para *Daphnia magna* foi de 0,07 ng/L (CASALDERREY et al. 1994); e para larvas, pós-larvas e adultos de lagosta americana (*Homarus americanus*) expostos a azametifós 3,57, 2,12 e 1,39 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (BURRIDGE et al. 1999). Porém, a toxicidade do paration metílico foi maior em alevinos de pacu do que a observada com o paration metílico para jovens de *G. affinis* com CL $_{50}$ de 13,48 mg/L (BOONE e CHAMBERS, 1996) e com o monocrotofós em *Prochilodus lineatus*, com CL $_{50}$ de 5,97 mg/L (PARMA de CROUX et al. 2002).

Para tilápias adultas (*Oreochromus niloticus*), com peso entre 57 e 98 g, a CL $_{(50-96h)}$ calculada foi de 2,2 mg/L para o malation (PATHIRATNE e GEORGE, 1998). Para

SHAO-NAN e DEFANG (1996), o malation foi considerado moderadamente tóxico para peixes, com CL_(50 - 96h) entre 0,25 e 15 mg/L. Esta faixa de toxicidade também foi observada para o paration metílico para alevinos e jovens de pacu (Tabela 2). Segundo BURRIDGE et al. (1999), não ocorreu diferença de letalidade do azametifós entre as formas larvas, pós-larvas e adultas dos organismos aquáticos invertebrados.

Após a exposição ao paration metílico, tanto os alevinos quanto os jovens apresentaram agitação e natação não coordenada em todos os tratamentos. Na primeira hora após a exposição, os alevinos dos tratamentos com as concentrações de 7,5; 10,0 e 12,5 mg/L e os jovens dos tratamentos 10,5; 12,0; 13,5 e 15,0 apresentaram sinais claros de intoxicação, com a natação rápida e errática, devido à ação do agrotóxico na inibição do sistema enzimático colinérgico. Durante a primeira hora de experimentação os peixes desses tratamentos nadaram com a cabeça para cima ou para baixo continuamente. Estes sinais estão de acordo com os observados por MURTY et al. (1984) para o *Mystus cavasius*, exposto ao paration metílico.

As porcentagens de mortalidade de alevinos e jovens em relação à concentração de paration metílico utilizada ocorrida durante a estimativa da CL_(l)_{50-96h} estão apresentadas na Tabela 3. A maior incidência de mortalidade ocorreu nas primeiras 24 horas de exposição. Neste período ocorreu mortalidade crescente nas concentrações de 5,0; 7,5; 10,0 mg/L para os alevinos e de 9,0; 10,5; 12,0 e 13,5 mg/L para os jovens. Nos tratamentos com 12,5 mg/L para os alevinos e com 15,0 mg/L para os jovens ocorreu à morte de todos os animais.

3.2. Azadiractina

O emprego da coluna cromatográfica ISRP-C₁₈ permitiu a injeção diluída (1:100; v/v) de 500 µL do extrato aquoso de nim em metanol, para a determinação da azadiractina. O tempo de retenção da azadiractina foi 8,82 ± 0,04 minutos, com um fator de retenção (K) de 7,48. A concentração detectada foi de 11,8 mg de azadiractina/L de EAFSN. Esta concentração é semelhante a concentração determinada para o extrato aquoso de sementes com 12 mg/L (GOVINDACHARI et al. 1999) e para o extrato seco de sementes com 10,3 mg/L (JARVIS et al. 1999).

A equação linear que representa a relação concentração-reposta e a concentração letal 50 % do EAFSN baseado na concentração de azadiractina para alevinos e para os jovens de *P. mesopotamicus* estão apresentadas na Tabela 2. As porcentagens de mortalidade de alevinos e jovens, em relação à concentração de azadiractina utilizada, ocorrida durante a estimativa da CL (I)_{50-96h} estão apresentadas na Tabela 3. A mortalidade de 100 % dos animais alevinos e jovens também ocorreram nas primeiras 24 horas de exposição, similar ao observado para o paration metílico.

Em todos os tratamentos foi verificado que na primeira hora de exposição à azadiractina os animais permaneceram no fundo do aquário. A seguir, começaram a apresentar natação errática, movimentos rápidos do opérculo. Nos tratamentos com 1,47 e 1,77 mg/L, os animais começaram a permanecer na superfície da coluna d água para captar oxigênio da interface água-atmosfera. Esse comportamento também foi descrito por OMOREGIE e OKPANACHI (1992) para tilápias (*Tilapia zilli*) expostas a 0,09 a 1,56 mg.dm⁻³ de azadiractina em óleo de nim.

A toxicidade aguda da azadiractina foi avaliada por DUNKEL e RICILARDS (1998) para seis espécies de invertebrados aquáticos: *Drunella grandis*, *D. doddsi*, *Skwala paralela*, *Brachycentrus occidentalis*, *B. americanus* e *Caecidotea intermedia*. A CL_{50-24h} estimadas variou de 1,8 a 9,2 mg/L para estas espécies. KREUTZWEISER et al. (1999), estimaram CL₅₀ entre 0,28 e 0,84 mg/L de azadiractina para oitos espécies de invertebrados aquáticos. A CL (I)_{50-96h} estimada para o *P. mesopotamicus* é similar às faixas de toxicidade aguda observadas para estes invertebrados (Tabela. 2).

SUTTON (2002) citou que os inseticidas á base nim (azadiractina), ao serem utilizados como alternativa aos inseticidas tradicionais, podem apresentar riscos ao ambiente aquático, principalmente aos insetos aquáticos e zooplâncton, especialmente os copépodos.

Segundo SRIVASTAVA e RAIDAZA (2001), a azadiractina não apresentou efeito embriofetotóxico e teratogênico em ratos, não produzindo efeito morfológico, visceral e esquelético. Portanto, esses autores consideraram a azadiractina como um biopesticida alternativo aos inseticidas sintéticos. SCHMUTTERER (1990) estimou a dose letal (DL₅₀) de 7000 mg/kg, para ratos e não foi observada toxicidade aguda oral para patos que ingeriram 5000 a 8750 mg/kg de azadiractina. Apesar desses trabalhos, dentre outros,

demonstrarem a baixa toxicidade da azadiractina para mamíferos e aves, é necessário cuidado na utilização deste pesticida natural no ambiente aquático. Isto porque, neste estudo, verificou-se que a toxicidade aguda foi alta e poderá resultar em alto risco de contaminação ambiental.

A utilização do extrato aquoso de folhas de nim deve ser mais estudada, pois além de sua alta toxicidade aguda para o *P. mesopotamicus*, outros fatores podem limitar a sua utilização, tais como: temperatura, luz ultravioleta, pH, partes da planta utilizada na preparação do extrato, degradação e efeito residual como o descrito por SCHMUTTERER (1990).

Tabela 2. Equações lineares concentração-resposta, R^2 e CL (I)_{50-96h} (mg/L) do paration metílico e da azadiractina para os alevinos e jovens de *Piaractus mesopotamicus*.

	Alevino		Jovem	
	Paration metílico	Azadiractina	Paration metílico	Azadiractina
Equação Linear	$y = 8,18x + 7,20$	$y = 101,96x - 31,12$	$y = 12,38x - 89,28$	$y = 99,07x - 31,11$
R^2	0,958	0,968	0,965	0,921
CL (I) _{50-96h}	3,97	1,30	9,89	1,18

Tabela 3. Mortalidade (%) de alevinos e jovens de *Piaractus mesopotamicus* nas diferentes concentrações de paration metílico e de azadiractina.

Alevino		Concentrações de Paration metílico (mg/L)					
0,0	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	
0	0	25	58,6	75	91,6	100	
Jovem							
0,0	7,5	9,0	10,5	12,5	13,5	15	
0	0	25	50	50	75	100	
Alevino		Concentrações de Azadiractina (mg/L)					
0,0	0,29	0,59	0,88	1,18	1,47	1,77	
0	0	0	33,3	33,3	66,6	100	
Jovem							
0,0	0,29	0,59	0,88	1,18	1,47	1,77	
0	0	25	25	50	75	100	

4. CONCLUSÕES

O paration metílico foi menos tóxico para os alevinos e para os jovens de pacu que o EAFSN baseado na concentração de azadiractina, indicando a necessidade de cuidados com a utilização de extratos aquosos de nim no ambiente aquático. Os sinais

de intoxicações causados pelo paration metílico e azadiractina em alevinos e jovens de pacu foram diferentes. As concentrações de 1,0 mg/L para os alevinos e de 7,5 mg/L para os jovens expostos ao paration metílico e 0,29 e 0,59 mg/L para os alevinos e de 0,29 mg/L para os jovens expostos a azadiractina não provocaram mortalidade nos animais. Portanto, estas concentrações podem ser utilizadas como referências em estudos de controle de parasitos em *P. mesopotamicus*, se confirmados com estudos de toxicidade crônica.

Acute toxicity of the insecticide methyl parathion and of the biopesticide azadirachtin from neem leaves (*Azadirachta indica*) to alevine and jovense of pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

5. ABSTRACT

The objectives of the present study were: to estimate the lethal concentration LC (I)_{50-96 h} of methyl parathion and of the aqueous extract of neem leaves to alevine and jovense pacu (*P. mesopotamicus*) and to determine the effect of body weight on acute toxicity. To determine the non-lethal concentrations to be used as initial references in efficacy studies on parasite control and to classify the environmental risk of the use of methyl parathion and neem in the control of pacu parasites and pathogens. Two experiments were performed under laboratory conditions for the determination of the LC (I)_{50-96 h}. The LC (I)_{50-96 h} of methyl parathion was 3.97 mg/L for alevine and 9.89 mg/L for jovense fish. The LC (I)_{50-96 h} of azadirachtin was 0.89 mg/L for alevine and 0.96 mg/L for jovense pacu. Concentrations of 1.0 and 7.5 mg/L of methyl parathion and of 0.29 and 0.59 mg/L of azadirachtin for alevine and jovense pacu, respectively, did not cause mortality in the exposed animals and can be used as references in studies on the control of parasites in pacu. Methyl parathion was less toxic to alevine and jovense pacu than azadirachtin, indicating the need for careful utilization of aqueous neem extracts in aquatic environments.

Key-words: methyl parathion, azadirachtin, acute toxicity, *Piaractus mesopotamicus*

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro: Processos: 142151/2001-7 (bolsa de doutorado do primeiro autor) e 477882/2003-0 (edital universal 2002).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUIANO, O.L.; MONTAGNA, C.M.; CHIFFLET DE LIAMAS, M.; GAUNA, L.; PECHEN de D'ANGELO, A.M. Comparative toxicity of parathion in early embryos and larvae of the toad, *Bufo arenarum* Hensel. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, v. 52, p. 649-655, 1994.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, Editora: American Public Health Association. 17ed. 1991, p. 81-143.

BATICADOS, M.C. e TENDENCIA, E.A. Effects for gusathion A on the survival and Shell quality of juvenile *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, New York, v. 93, p.9-19, 1991.

BOONE, J.S. e CHAMBERS J.E. Time course of inhibition of cholinesterase and acetylcholinesterase activities and nonprotein sulfhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in mosquitofish (*Gambusia affinis*). **Fundam. Applied Toxicol**, Akron, v. 29, p. 202-207, 1996.

BURRIDGE, L.E.; HAYA, K.; ZITKO, V.; WADDY, S. The lethality of salmosan (Azamethiphos) to american lobster (*Homarus americanus*) larvae, postlarvae and adults. **Ecotox. Environ. Safety**, San Diego, v. 43, p. 165-169, 1999.

CALUMPANG, S.M.F.; MEDINA, M.J.B.; TEJADA, A.W.; MEDINA, J.R. Toxicity of chlorpyrifos, fenitrothion, monocrotophos and methyl parathion to fish and frogs after a simulated overflow of paddy water. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, v. 58, p. 909-914, 1997.

CASALDERREY, A.F.; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. Chronic toxicity of methylparathion to *Daphnia magna*: Effects on survival, reproduction and growth. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, p. 43-49, 1994.

CETESB. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Água – teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático**. São Paulo. v. II, 1999, p. 1-29.

DUNKEL, F.V. e RICILARDS, D.C. Effect of an azadirachtin formulation on six non target aquatic macroinvertebrates. **Environ. Entomol**, College Park, v. 27, n. 3, p. 667-673, 1998.

GOKTEPE I. e PLHAK L. Comparative toxicity of two *Azadirachtin*-based neem pesticides to *Daphnia pulex*. **Environ. Toxicol. Chem**, Houston, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2002.

GOVINDACHARI, T.R. Chemical and biological investigations on *Azadirachta indica* (the neem tree). **Curr. Sci**, Bangalore, v. 63, n.3, p.117-122, 1992.

GOVINDACHARI, T.R.; GOPALAKRISHNAN, G.; SURESH, G. Triterpenoidal constituents of an aqueous extract from neem kernels. **Fitoterapia**, Milano, v. 70, p. 558-560, 1999.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol**, Iowa, v. 7, p. 714-719, 1977.

HAYES, W.J.Jr e LAWS, E.R.Jr. **Handbook of pesticide toxicology. General principles**. Academic Press, Inc, San Diego, v. 1, 1991, 496p.

IBAMA. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes. Parte D. 3. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, DF, 1987.

JARVIS, A.P.; MORGAN, E.D.; EDWARDAS, C. Rapid separation from neem seed extracts. **Phytoc. Anal**, Sussex, v. 10, p. 39-43, 1999.

KREUTZWEISER, D.P. CAPELL, S.S. SCARR, T.A. Acute lethal and sublethal effects of a neem-based insecticide on nontarget aquatic insects in stream channels. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, v. 63, p. 365-371, 1999.

LARINI, L. **Toxicologia**. Editora: Manole. São Paulo, 1987. 315p.

MARTINEZ-TABCHE L.; GALAR, C.L.; RAMIREZ, M.B.; MORALES, R.A. Parathion effect on acetylcholinesterase from fish through na artificial trophic chain: *Ankistrodesmus falcatus*, *Moina macrocopa* and *Oreochromis hornorum*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, v. 52, p. 360-366, 1994.

MENEZES, M.L. e FÉLIX, G. On line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methyl-parathion and pentachlorophenol pesticides from raw milk. **J. Liq. Chrom. Rel. Technol**, New York, v. 21, n. 18, p.2863-2871, 1998.

MENEZES, M.L.; SANCHEZ, A.; MARTINS, P.R.; GARCIA, M.A.Z.; CARDOSO, A.A.; LESSI, P.; PEREIRA, O.C.M. Determinação por injeção direta no HPLC de cocaína em amostras de urina e em amostras de papелotes de cocaína e crack. **Salusvita**, Bauru, v. 19, n. 2, p. 73-80, 2000.

MOTOYAMA, N.; NISHIZAWO, Y.; NAGAKURA, A.; TAKEMARA, T.; DAUTERMAN, W.C. 1991. Selective inhibition of the cytochrome P-450 dependent monooxygenase from the liver rat and house fly abdomen. In: Hodgson, E. Roe, R.M. Motoyama, N. (Eds). **Reviews in pesticide toxicology I. North Carolina State University, North Carolina**.

MURTY, A.S. **Toxicology of pesticide to fish**. Boca Raton, Editora: CRC Press. 1988. v. 1, 129p.

MURTY, A.S.; RAMANI, A.V.; CHRISTOPHER, K.; RAJABHUSHANAM, B.R. Toxicity of methyl parathion and fensulfathion to the fish *Mystus cavasius*. **Environ. Pollut. (series A)**, Massachusetts, v. 34, p. 37-46, 1984.

NOGA, E.J. **Fish disease: diagnosis and tratament**. Mosby, North Carolina State University, College of Veterinary Medicine, St. Louis, 1996, 367p.

OMOREGIE, E. e OKPANACHI, M.A. Growth of *Tilapia zilli* exposed to sublethal concentrations of crude extracts of *Azadirachta indica*. **Acta. Hydrobiol**, Krakow, v. 34, n. 3, p. 281-286, 1992.

PARMA de CROUX, M.J.; LOTESTE, A.; CAZENAVE, J. Inhibition of plasma cholinesterase and cute toxicity of monocrotophos in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, v. 69, p. 356-363, 2002.

PATHIRATNE, A. e GEORGE, S.G. Toxicity of malathion to nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. **Aquatic. Toxicol**, Amsterdam, v. 43, p. 261-271, 1998.

RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington, 1985. 665p.

RODRIGUES, E.D.L.; RANZANI-PAIVA, M.J.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L. Efeito agudo do organofosforado Dipterex 500 (Trichlorfon) em baço de curimatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **Bol. Tec. CEPTA**, Pirassununga, p. 197-203, 1997.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture for South American fish: a review. **Aquaculture**, New York, v. 54. p. 205-240, 1986.

SCHAAF, O.; JARVIS, A.P. ESCH, A.V.D.; GIAGNACOVO, G.; OLDHAM, N.J. Rapid and sensitive analysis of azadachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **J. Chromat. A**, Amsterdam, v. 886, p. 89-97, 2000.

SCHMUTTERER, H. Properties and potencial of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Ann. Rev. Entomol**, Stanford, v. 35, p. 271-297, 1990.

SENHORINI, J.A.; FONTES, N.A.; LUCAS, A.F.B.; SANTOS J.R.S. Larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Pisces, Characidae) em viveiros com e sem organofosforado (folidol 600). **Bol. CEPTA**, Pirassununga, n. 2, p.11-22, 1991.

SHAO-NAN, L. e DE-FANG, F. Correlation between biochemical parameters and susceptibility of freshwater fish to malathion. **J. Toxicol. Environ. Heath**, Washington, v. 48, p. 413-418, 1996.

SILVA, A.J. **Aspectos da alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895) (Pisces, Characidae) no pantanal de Mato Grosso**. Rio de Janeiro. Dissertação (UFRJ-Mestrado-Zoologia). 1985. 92p.

SILVA, H.C.; MEDINA, H.S.G.; FANTA, E.; BACILA, M. Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei). **Comp. Biochem. Physiol. C**, Oxford, v. 105 n. 2. p.197-201, 1993.

SINGH, K.; SINGH, A.; SINGH, D.K. Molluscicidal activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). **J. Ethonopharm**, Lausanne, v. 52, p. 35-40, 1996.

SRIVASTAVA, M.K. e RAIZADA, R.B. Assessment of embryo/fetotoxicity and teratogenicity of azadirachtin. **Food. Chem. Toxicol**, Oxford, v. 39, p. 1023-1027, 2001.

SUDANRAM, K.M.S. e CURRY, J. High performance liquid chromatographic determination of azadirachtin in conifer and deduos foliage, forest soils, leaf litter and stream water. **J. Liq. Chromat**, Florida, v. 16, n. 15, p. 3275-3290, 1993.

SUTTON, T. Environmental effects of neem-based insecticides on zooplankton communities in Forest ponds. Disponível em: <www.fnr.purdue.edu>. p. 1-9, 2002. Acesso em: 20/03/2004.

USEPA, (United States Environmental Protection Agency). Guidelines for the health: risk assessment guidamce for superfund (RAGS). 2002. Disponível em: <www.epea.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7>. Washington, Acesso em: 10/02/2004.

VAN DER NAT, J.M.; VAN DER LUIS, W.G.; SILVA, K.T.D.; LABADIE, R.P. Ethnopharmacognostical survey of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). **J. Ethnopharm**, Lausanne, v. 35, p. 1-24, 1991.

WALTON, W.J.; BROWN, K.L.; LYDY, M.J. Diurnal fluctuations in toxicity in two fish species: *Gambusia affinis* and *Notropis ludibundis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, p. 414-421, 1997.

WAN, M.T.; WATTS, R.G.; ISMAN, M.B.; STRUB, R. Evaluation of acute toxicity to jovense pacific northwest salmon of azadirachtin neem extract and neem-based products. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, New York, v. 56, p. 432-439, 1996.

Histopatologia de brânquia e fígado de *Piaractus mesopotamicus* exposto a concentrações subagudas do inseticida paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim*

Claudinei da Cruz¹, Joaquim Gonçalves Machado Neto¹, Karina Simões², Márcia Rita Fernandes Machado³.

¹Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, Departamento de Fitossanidade, FCAV/UNESP e Centro de Aqüicultura da UNESP/CAUNESP, Câmpus de Jaboticabal.

²Profa. Dra. da Faculdade de Nutrição da Universidade Metodista de Piracicaba, UNIMEP, Câmpus de Lins.

³Profa. Dra. do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal.
Departamento de Fitossanidade.

Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14870-000

Jaboticabal, São Paulo.

E-mail: joaquim@fcav.unesp.br

* Artigo formatado segundo a norma do Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de concentrações subletais de paration metílico e da azadiractina contida no extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN) na estrutura histológica das brânquias e no fígado de alevinos e jovens de pacu

(*Piaractus mesopotamicus*). Os alevinos de pacu foram expostos a concentrações de 0,0; 1,0; 2,5; 5,0; e 7,5 mg/L de paration metílico e os jovens foram expostos a concentrações de 0,0; 7,5; 9,0; 10,5; 12,0 e 13,5 mg/L. As concentrações subletais do EAFSN para alevinos e jovens de pacu foram de 0,0; 0,29; 0,59; 0,88; e 1,18 mg de azadiractina/L de. Os peixes foram expostos por 96 horas a concentrações subletais. As amostras de brânquias e de fígado foram retiradas e fixadas em solução fixadora de Bouin e formaldeído tamponado. Após a fixação, foi realizado desidratação, inclusão em parafina plástica, microtomia com obtenção de seções histológicas de 5 µm de espessura e coloração com hematoxilina-eosina e PAS/H. Nas brânquias de pacu expostos ao paration metílico foram observados congestão sangüínea, alterações na altura do epitélio de revestimento, de células secretoras de muco e de células-cloreto, fusão lamelar, edemas subepiteliais, hemorragias intersticial, fusão lamelar, desorganização da estrutura lamelar. As alterações causadas pelo EAFSN foram: edema subepitelial, aumento das células de revestimento e fusão lamelar, fusão apical das lamelas secundárias, aumento das células de revestimento e células-cloreto, diminuição no epitélio de revestimento interlamelar, estase sangüínea e diminuição das células mucosas. No fígado dos animais expostos ao paration metílico foi observado congestão sangüínea, fusão celular, hiperplasia e hipertrofia dos hepatócitos, desarranjo da organização cordonal dos hepatócitos. Os fígados animais expostos a azadiractina apresentaram desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos, vacuolização citoplasmática, necrose das células epiteliais de revestimento dos canalículos biliares.

Palavras-chaves: teleósteos, *Piaractus mesopotamicus*, pesticida natural, organofosforado,

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the effects of sublethal concentration of methyl parathion and azadirachtin present in the aqueous extract of dry neem leaves (AEDNL) on the histological structure of the gills and liver of fry and juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fry pacu were exposed to methyl parathion

concentrations of 0.0, 1.0, 2.5, 5.0 and 7.5 mg/L and juvenile fish were exposed to concentrations of 0.0, 7.5, 9.0, 10.5, 12.0 and 13.5 mg/L. The sublethal concentrations of azadirachtin for fry and juvenile pacu were 0.0, 0.29, 0.59, 0.88 and 1.18 mg/L AEDNL. The exposure time was 96 hours. Samples of the gills and liver were removed, fixed in Bouin's fixative and buffered formaldehyde. After fixation, the specimens were dehydrated, embedded in plastic paraffin, cut into 5-µm thick histological sections with a microtome, and stained with hematoxylin-eosin and PAS/H. The gills of pacu exposed to methyl parathion showed blood congestion, alterations in the height of the lining epithelium, mucus-secreting cells and chloride cells, lamellar fusion, subepithelial edema, interstitial hemorrhage, and disorganization of the lamellar structure. Azadirachtin caused the following alterations: subepithelial edema, increased lamellar fusion, apical fusion of secondary lamellae, an increase in the number of lining cells and chloride cells, a reduction in the interlamellar lining epithelium, blood stasis, and a decline in the number of mucous cells. The liver of animals exposed to methyl parathion was characterized by blood congestion, cell fusion, hepatocyte hyperplasia and hypertrophy, and derangement of the cord-like organization of hepatocytes. The liver of animals exposed to azadirachtin presented disorganization of the cord-like arrangement of hepatocytes, cytoplasmic vacuolization, and necrosis of epithelial cells lining the bile canaliculi.

Key-words: teleostei, *Piaractus mesopotamicus*, natural pesticide, organophosphorus.

1. INTRODUÇÃO

A saúde dos peixes é um indicador da boa qualidade de água (COUTH, 1988) e alterações físico-químicas ou bióticas no meio aquático pode induzir lesões nas brânquias, fígado e rim (SINDERMANN, 1983). As brânquias e a pele são os órgãos dos peixes inicialmente afetados pelos agentes tóxicos. Estes órgãos têm grande superfície de contato e ambos apresentam células de muco importantes na resistência

à patógenos e a substâncias tóxicas (SHEPHARD, 1994). Após a absorção na pele ou nas brânquias, as substâncias tóxicas atingem o fígado, que tem papel fundamental no seu metabolismo (JOBILING e SUMPTER, 1993).

O fígado exerce importantes funções vitais para os peixes como a síntese de vários componentes do plasma sanguíneo; estocagem e metabolismo de glicose e glicogênio; liberação de glicose e desintoxicação do organismo (DUTTA et al. 1993). O fígado é o maior órgão de metabolismo de xenobióticos associados à poluição aquática (KRANZ e DETHEFSEN, 1990).

A maioria dos pesticidas são biotransformados em metabólitos pelo fígado, pela ação de enzimas da fração solúvel das mitocôndrias e microssomas (LARINI, 1979). Em alguns casos, esse metabolismo produz substâncias mais tóxicas. O paration metílico é transformado em paraoxon por oxigenação no retículo endoplasmático dos hepatócitos, devido à ação de enzimas S-alquil transferase (FANTA et al. 2003). Conseqüentemente, o fígado dos peixes é o órgão que sofre uma série de alterações morfológicas devido à exposição a pesticidas (GILL et al. 1988; RODRIGUES e FANTA, 1998). Geralmente, encontra-se no fígado a maior concentração dos resíduos de pesticidas, especialmente dos organofosforados (ANSARI e KUMAR, 1987a,b). Entre os efeitos dos organofosforados nos hepatócitos destaca-se a retenção da bile dentro dos hepatócitos, reduzindo o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos no aparelho digestório dos peixes. O núcleo dos hepatócitos torna-se picnótico, indicando baixa funcionabilidade celular, além do surgimento de necroses em alguns pontos do órgão (FANTA et al. 2003).

Outros estudos sobre a ação e alterações provocadas por substâncias tóxicas nos tecidos de organismos aquáticos foram realizados na brânquia de *Lepomis macrochirus* exposto ao malation com a ocorrência de necrose no filamento primário, edema e fusão lamelar (RICHMONDS e DUTTA, 1989); no fígado de *Heteropneustes fossilis* exposto ao malation com vacuolização do citoplasma e núcleo picnótico dos hepatocitos (DUTTA et al. 1993); no fígado *Sparus auratus* exposto ao sulfato de sódio dodecil com desarranjo da organização cordonal de (RIBELLES et al. 1995); no hepatoprâncreas de *Macrobrachium malcolmsonii* exposto ao endosulfan com alteração na histarquitetura do órgão e necrose (SARAVANA e GERALDINE, 2000); no fígado com fibrose hepática

e hipertrofia dos hepatócitos, nas brânquias com aneurisma e fusão lamelar e no rim com acúmulo de material eosinofílico nos glomérulos de *Platichthys flesus*, *Pomatoschistus minutus* e *Zoarcetes viviparus* expostos a hidrocarbonetos poli aromáticos (STENTIFORD et al. 2003); e na brânquia de *Danio rerio* exposto ao tetraclorodibenzol-*p*-dioxina com aumento das células mucosas na lamela primária, hipertrofia da lamela e fusão das lamelas secundárias (ZODROW et al. 2004).

O paration metílico é um dos inseticidas mais empregados para o controle de predadores aquáticos em tanques de produção e na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixe, com o objetivo de maximizar a produção de rotíferos (SENHORINI et al. 1991; SILVA et al. 1993), além de ser utilizado para o controle de odonatas, copépodes e monogenéticos (NOGA, 1996).

Entre os produtos que podem apresentar eficácia no controle de patógenos e resultar em menor impacto no meio ambiente está o pesticida natural azadiractina, um composto natural, isolado da planta nim, *Azadirachta indica* (Meliaceae) (SCHAAF et al. 2000). Entretanto, ainda não foram encontrados na literatura estudos sobre alterações histopatológicas deste pesticida em peixes.

Para este estudo foi utilizado o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da família Characidae e subfamília Serrasalminae, espécie endêmica da bacia dos rios Paraná-Paraguai, de importância comercial, sendo uma das espécies de peixe mais criadas na região neotropical (SAINT-PAUL, 1986).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de concentrações subagudas do inseticida organofosforado paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN), baseado na concentração de azadiractina, sobre a estrutura histológica de brânquias e fígado de alevinos e jovens de pacu (*P. mesopotamicus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados peixes nos estágios de alevino e jovem da espécie *Piaractus mesopotamicus*, provenientes do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Os animais foram aclimatados por dez dias na sala de bioensaios, de acordo com as recomendações do IBAMA (1987) e MURTY (1988). Para tanto, foi utilizada uma caixa de cimento amianto de 250 L, com sistema de aeração contínua por bombas de ar. Neste período, os animais foram alimentados *ad libitum* uma vez ao dia com ração comercial.

O sistema de condução do teste foi o estático, com 96 horas de exposição aos agrotóxicos e sem alimentação dos peixes. A água utilizada nos testes foi da rede de abastecimento local, proveniente de poço semi-artesiano. As condições ambientais foram avaliadas diariamente e os valores foram: oxigênio dissolvido, entre 8,90 e 9,0 mg/L; condutividade elétrica da água, entre 0,160 e 0,180 mCs; amônia total (NH_3^+), entre 130 e 160 $\mu\text{g/L}$; e pH entre 7,20 e 7,45. A temperatura da sala de bioensaio foi mantida entre 27 e 28 °C; e a água entre 26,5 e 27 °C.

No experimento foram utilizados dois grupos de peixes: alevinos com peso entre 1 e 2 g e jovens com peso entre 50 e 70 g, na densidade máxima de 5 g de peixe/L de água, conforme a metodologia da APHA (1991) e da CETESB (1999).

Os alevinos foram expostos às concentrações de 0,0; 1,0; 2,5; 5,0; e 7,5 mg/L de paration metílico, com quatro repetições e cinco peixes por repetição. Os jovens foram expostos às concentrações de 0,0; 7,5; 9,0; 10,5; 12,0 e 13,5 mg/L, com quatro repetições e cinco peixes por repetição.

Os alevinos e jovens de pacu foram expostos a concentrações de 0,0; 0,29; 0,59; 0,88; e 1,18 mg/L de azadiractina contida no EAFSN, com quatro repetições. Os experimentos foram realizados com as mesmas concentrações para os dois grupos de peixes, pois a toxicidade aguda do EAFSN não permitiu o aumento de sua concentração com o aumento do peso dos animais, de acordo com os resultados de testes preliminares.

2.1. Análise histológica das brânquias e do fígado

As amostras do fígado e das brânquias dos animais de cada tratamento foram coletadas após 96 horas de exposição e imersas em solução fixadora de Bouin, por 24 horas (BEHMER et al. 1976). Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol/água (v/v), diafanizadas e incluídas em Histosec[®] (Merck). A seguir, foi realizada a microtomia em micrótomo automático (Leica, RM-2155), obtendo-

se cortes, em seqüência semi-seriada (1 corte/100 µm desprezados), de três a cinco µm de espessura. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina e reagidos em PAS/H (ácido periódico de Schiff), segundo as metodologias propostas por BEHMER et al. (1976).

Para melhor caracterização da morfologia da brânquia e do fígado, fragmentos desses órgãos foram também incluídos em historesin[®] (Leica-Germany). Os fragmentos foram fixados em solução de McDowell (glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4 % e tampão fosfato pH 7,4; 0,1 M), durante 24 horas (McDOWEEL e TRUMP, 1976). A seguir, foram submetidos a sucessivos banhos em tampão fosfato de Sorënsen (pH 7,2; 0,1M) durante sete dias e desidratação em álcool 80 %. O processo de pré-infiltração foi realizado com solução de glicol-metacrilato e etanol a 80 % em diferentes concentrações (1:3, 1:1, 3:1 v/v), durante três horas. Em seguida, o material foi embebido em glicol-metacrilato, por uma hora. Na seqüência, o material foi incluído em uma mistura contendo solução de pré-inclusão em glicol-metacrilato ativado e endurecedor em histomold. Após endurecimento parcial da solução, os blocos foram colocados em estufa à temperatura de 45 °C, por aproximadamente 72 horas, para a polimerização e endurecimento. Foram realizados cortes histológicos de dois µm de espessura com navalhas de vidro e, posteriormente, corados com hematoxilina/floxina B, azul de toluidina a 0,5 %/fucsina básica a 0,5 % e azul de toluidina a 1 %.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Histopatologia de brânquias

As brânquias dos peixes dos tratamentos controles estavam constituídas por quatro arcos branquiais dispostos em cada lado da faringe, formando as fendas branquiais. Os arcos branquiais sustentavam duas fileiras de lamelas primárias ou

filamentos branquiais. As lamelas mostraram-se dispostas acima e abaixo dos filamentos. Os filamentos branquiais estavam revestidos por epitélio estratificado que, em intervalos regulares se eleva, formando as lamelas (Figura 1A). As lamelas secundárias altas e constituídas por duas camadas de células epiteliais pavimentosas, células pilares, células-cloreto e as células mucosas como o descrito por SEVERI et al. (2000) para o *P. mesopotamicus*.

Os alevinos expostos a 1,0 e 2,5 mg/L de paration metílico não apresentaram alterações em relação ao tratamento controle. No tratamento com 2,5 mg/L ocorreu congestão (Figura 1B), em algumas regiões da lamela secundária. Segundo CENGIZ e UNLU (2002), após a exposição do *Gambusia affinis* ao endosulfan, a primeira alteração histopatológica observada foi hemorragia intersticial lamelar.

Nos tratamentos com 5,0 mg/L e 7,5 mg/L de paration metílico foi verificado, hiperplasia das células de revestimento no espaço interlamelar, de células secretoras de muco e de células-cloreto. Estas características também foram descritas por MALLATT (1985) para *Salmo gairdneri*. Segundo este autor, o aumento do número de das células mucosas provoca hipersecreção, visando à proteção da estrutura tecidual em situações ambientais adversas e em exposição a alguns tipos de tóxicos. As mucossubstâncias produzidas por estas células apresentam poliânions, que podem atuar como barreira protetora contra a penetração do organofosforado no epitélio respiratório do pacu. A hiperplasia das células secretoras de muco também foi observada nas brânquias de salmão do atlântico (*Salmo salar*) tratado com levamisol (MORRISON et al. 2001).

Os animais jovens expostos às concentrações de 5,0 e 7,5 mg/L de paration metílico apresentaram as brânquias semelhantes as dos animais do tratamento controle. Nas concentrações de 9,0, 10,5 e 12 mg/L (Figura 1 C) ocorreram fusão de algumas lamelas secundárias e congestão nos filamentos branquiais e nas lamelas, resultando em pequenos edemas. Além dessas alterações, no tratamento com 12,0 mg/L ocorreu hemorragia intersticial. A fusão lamelar também foi observada em *Lepomis macrochirus*, após 72 horas de exposição ao malation (RICHMONDS e DUTTA, 1989). Esta lesão ocorre devido ao aumento da adesão entre as células epiteliais e o sistema de sustentação das células pilares, acompanhado pelo colapso

da integridade da estrutura da lamela secundária (SKIMORE e TOVELL, 1972). A fusão lamelar foi também observada no *Salmo salar* tratado com levamisol intraperitoneal, causada por hiperplasia e hipertrofia das células do filamento branquial (MORRISON et al. 2001), em *Oncorhynchus mykiss* tratados com formalina (SPEARE et al. 1997) e em peixes de estuário (*Platichthys flesus*, *Pomatoschistus minutus* e *Zoarces viviparus*) expostos a hidrocarbonetos poli aromáticos (PAHs) (STENTIFORD et al. 2003). A fusão lamelar pode ser um mecanismo de proteção do peixe, pois diminui a superfície vulnerável da brânquia ao agente intoxicante (CENGIZ e UNLU, 2002). Assim, o pacu pode ter desenvolvido este mecanismo para sua proteção, pois o paration metílico apresenta alta permeabilidade nas membranas celulares (LARINI, 1987). O pacu pode ter desenvolvido esse mecanismo adaptativo para aumentar a tolerância ao inseticida, pois este animal está sujeito a grandes variações sazonais de qualidade de água em sua área de origem.

No tratamento com 13,5 mg/L ocorreu fusão lamelar, desorganização e rompimento da estrutura lamelar e necroses localizadas (Figura 1F) Estas alterações estão de acordo com as observadas por RICHMONDS e DUTTA (1989) para o *Lepomis macrochirus* exposto ao malation.

As características histopatológicas das brânquias dos alevinos expostos ao EAFSN, nas concentrações de 0,29 e 0,59 mg de azadiractina/L foram às do tratamento controle. Porém, no tratamento com 0,59 mg/L ocorreu edema subepitelial em algumas regiões (Figura 1D), hiperplasia do epitélio de revestimento e fusão lamelar. A presença de edema subepitelial também foi observada por RICHMONDS e DUTTA (1989), em *L. macrochirus* exposto ao malation, por DOMITROVIC (1997), em *Aequidens portalegrensis* ao clorpirifós e por FANTA et al. (2003), para o *Corydoras paleatus* ao paration metílico.

Nas concentrações de 0,88 e 1,18 mg/L de azadiractina ocorreu edema subepitelial, fusão apical das lamelas secundárias, hiperplasia das células de revestimento e células cloreto (Figura 1E). As alterações histopatológicas nestes tratamentos foram semelhantes às observadas por SPEARE et al. (1997) *S. salar* e *Oncorhynchus mykiss* tratados com formalina. Porém, esses autores não relataram aumento do número de células-cloreto. Esse aumento foi considerado por

FERNANDES et al. (1998), no cascudo (*Hypostomus plecostomus*) exposto a água destilada, como uma resposta adaptativa à baixa concentração de íons na água ou ao desbalanço no equilíbrio ácido-base.

Para os peixes jovens, nas concentrações de 0,29 mg/L as características foram similares às do tratamento controle. Na concentração de 0,59 mg/L ocorreu perda do filamento braquial devido, possivelmente, a hiperplasia das células do epitélio de revestimento interlamelar semelhante ao descrito por DOMITROVIC (1997) em peixes expostos a formalina e ao verde malaquita. Na concentração de 0,88 mg/L ocorreu cogestão e diminuição do número de células mucosas. No tratamento com 1,18 mg/L ocorreu telangientasia, edema subepitelial, hiperplasia do epitélio interlamelar e fusão apical das lamelas secundárias como o observado nas brânquias de *G. affinis* exposta ao endossulfan durante 30 dias (DOMITROVIC, 1997; CENGIZ e UNLU, 2002).

As alterações histopatológicas nas brânquias provocadas pelo paration metílico e pela azadiractina foram similares às descritas por ROMBOUGH e GARDISE (1977) e MALLATT (1985). Segundo estes autores, as alterações provocadas nas brânquias por grande número de substâncias, entre elas os metais pesados, os organofosforados e os organoclorados são similares. Segundo RANDALL et al. (1996) a brânquia geralmente absorve os pesticidas solúveis em água e compostos lipossolúveis. Portanto, os organofosforados não têm dificuldade de atravessar membranas das células deste sistema (FANTA et al. 2003). O paration metílico e o EAFSN podem ter atingido as brânquias do pacu pela da superfície externa da lamela secundária e pela corrente circulatória. A entrada do paration metílico e do EAFSN pelo mecanismo contra-corrente e o seu efeito direto nas células das lamelas podem ter danificado a estrutura branquial. O efeito secundário da desorganização da estrutura branquial é a menor eficiência na absorção de oxigênio, devido ao aumento da distância de difusão lamelar (FANTA et al. 2003).

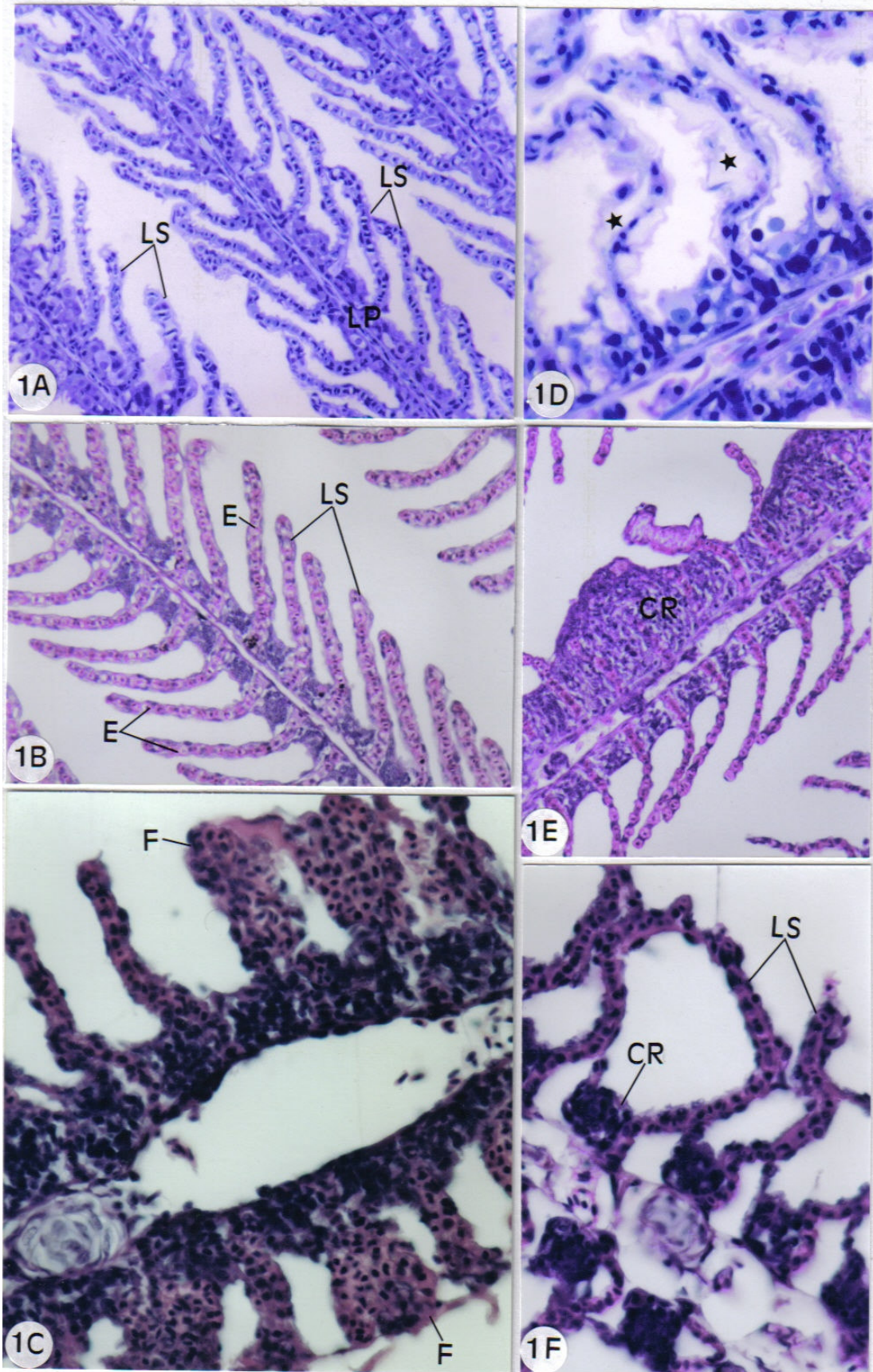


Figura 1. Fotomicrografia de brânquias de pacu. **A.** Organização das lamelas primárias (LP) e secundárias (LS) das brânquias de alevinos no tratamento controle. AT/Fucsina básica. 200x. **B.** Presença de congestão (E) nas lamelas secundárias (LS) dos alevinos expostos a 2,5 mg de paration metílico/L. H/E. 200x. **C.** Fusão lamelar (F) nas brânquias dos jovens expostos a 12 mg de paration metílico/L. H/E. 400x. **D.** Edema subepitelial (estrela) nas lamelas secundárias de peixe jovens exposto a 0,59 mg de azadiractina/L. AT/Fucsina básica. 400x. **E.** Hiperplasia das células de revestimento (CR) interlamelar, telangiectasia (T) de pacu jovens expostos a 1,18 mg de azadiractina/L. H/E. 200x. **F.** Desorganização da lamela secundária (LS) e das células de revestimento (CR) interlamelar de jovens de pacu exposto a 13,5 mg de paration metílico/L. H/E. 400x.

3.2. Histopatologia do fígado

O fígado do pacu nos tratamentos controle, de alevinos e jovens de pacu, apresentou organização cordonal do arranjo dos hepatócitos, formando placa de células em contato direto com os sinusóides. Os hepatócitos apresentaram forma hexagonal, com núcleo central, basófilo, cromatina descondensada e um nucléolo visível. O citoplasma róseo indicou alta acidofilia e presença de alguns grânulos de glicogênio, como o descrito por SOUZA et al. (2001) para o *P. mesopotamicus*.

Os alevinos expostos a 1,0 mg/L de paration metílico apresentaram características histológicas do fígado semelhantes às dos animais do tratamento controle, situação também observada no tratamento com 2,5 mg/L, porém ocorreu congestão nos capilares sinusóides em algumas regiões.

Os tratamentos com 5,0 e 7,5 mg/L de paration metílico apresentaram fusão celular e hipertrofia dos hepatócitos em algumas regiões, principalmente, próximo das veias centrais. Estas concentrações do inseticida na água causaram desarranjo da organização cordonal dos hepatócitos no parênquima hepático (Figura 2E).

Os fígados dos jovens expostos as concentrações de 5,0, 7,5 e 9,0 mg/L de paration metílico apresentaram características histológicas semelhantes ao tratamento controle. Porém, nos tratamentos com 7,5 e 9,0 mg/L foi observado diminuição da acidofilia citoplasmática e, em algumas regiões, ocorreu perda do arranjo cordonal dos hepatócitos com pontos caracterizando necrose com a presença de núcleos picnóticos.

As alterações que ocorreram no fígado dos alevinos e jovens de pacu nesses tratamentos foram similares às descritas por FANTA et al. (2003), para o *C. paleatus*

exposto ao paration metílico, por RODRIGUES e FANTA (1998), para o *Brachydario rerio* exposto por oito horas ao dimetoato, por DUTTA et al. (1993) para o *Heteropneustes fossilis* exposto por 96 horas ao malation e por PATWARDHAN e GAIKWAD (1991), em *G. affinis*, exposto ao sumition. Foi verificado nestes trabalhos que os inseticidas organofosforados provocaram mudança na granulação citoplasmática dos hepatócitos, reduzindo a eficiência do fígado, levando o mau funcionamento de outros órgãos do peixe e pode causar a morte do animal. Estas alterações podem indicar a degeneração inicial dos processos intracelulares dos hepatócitos, pois o fígado realiza importantes funções no processo de desintoxicação do animal (DUTTA et al. 1993; HASCHEY e ROUSSEAU, 1996).

No tratamento com 10,5 mg/L ocorreu hipertrofia dos hepatócitos que adquiriram formato arredondado, com citoplasma claro, diminuindo a acidofilia. Nesse tratamento também ocorreu congestão nos sinusóides. No tratamento com 12 e 13,5 mg/L de paration metílico ocorreu desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos em algumas regiões, principalmente próximo às veias centrais. Em outras regiões também ocorreu congestão sangüínea. Os hepatócitos apresentaram hipertrofia com deslocamento do núcleo para a periferia da célula (Figura 2B e 2C).

Para os alevinos expostos ao EAFSN baseado na concentração de azadiractina, foi observado que os fígados dos animais expostos aos tratamentos com 0,29, 0,59 e 0,88 mg/L apresentaram características histológicas semelhantes ao tratamento controle. No tratamento com 1,18 mg/L ocorreu desorganização do arranjo cordonal e vacuolização citoplasmática dos hepatócitos (Figura 2D) e em algumas regiões observou-se necrose das células epiteliais de revestimento dos canalículos biliares com picnose do núcleo das células.

Os jovens de pacu expostos a azadiractina nas concentrações de 0,29, 0,59 e 0,88 mg/L apresentaram fígado semelhante aos animais do tratamento controle, porém com congestão sangüínea nas três concentrações. No tratamento com 1,18 mg/L ocorreu desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos (Figura 2E), vacuolização do citoplasma celular e, em algumas regiões, necrose das células epiteliais dos canalículos biliares.

A desorganização do arranjo cordonal também foi observada por DUTTA et al. (1993) em *H. fossilis* exposto ao malation e por RIBELLES et al. (1995) em *S. auratus* exposto ao detergente dodecil sulfato de sódio. Porém nestes estudos não foram observados focos de necrose no tecido hepático como o relatado por FANTA et al (2003), em *C. paleatus* exposto a concentração subletal de paration metílico na água e na dieta. Pontos de necrose também foram observados por RODRIGUES e FANTA (1998), em *B. rerio*, em concentrações subletais de dimetoato, após 72 horas de exposição. As diferentes lesões hepáticas descritas nestes estudos podem ser atribuídas à concentração, tempo de exposição e dos mecanismos desintoxicação dos animais. Outros fatores que podem influenciar as diferentes respostas histopatológicas são; espécie, idade, sexo e estágio de maturidade sexual, período sazonal e migração (BARNI et al.1985; BERNET et al. 1999).

O EAFSN causou efeitos histopatológicos menores no fígado dos alevinos e jovens de pacu, quando comparado ao paration metílico. Porém, as concentrações subletais foram menores, indicando que o EAFSN baseado na concentração de azadiractina foi mais tóxico do que o paration metílico, provocando efeitos histopatológicos semelhantes ao inseticida em concentrações maiores.

De acordo com essas observações, o pacu pode apresentar maior sensibilidade a azadiractina, onde pequenas concentrações poderiam levar a mortalidade dos animais sem causar alterações histopatológicas, possivelmente devido à ausência de um mecanismo de metabolização e excreção descrita por BERNET et al. (1999) para outros ingredientes ativos.

Segundo JOHNSON et al. (1993), as alterações na histologia dos órgãos aparecem em tempo médio como resposta ao estresse subletal. Assim, como ainda não é conhecido o mecanismo de desintoxicação da azadiractina nos peixes, faz-se necessário testar outros tempos de exposição para o pacu, com o objetivo de avaliar a ocorrência de alterações irreversíveis no fígado. Por outro lado, o paration metílico causou alterações mais evidentes no fígado dos peixes expostos, tanto nos alevinos como nos jovens. Estas alterações são menos severas que as citadas por outros autores, permitindo classificá-las como reversíveis (MONTENEGRO e FRANCO, 1999),

exceto a necrose dos canalículos biliares e a ruptura epitelial das lamelas secundárias observadas na maior concentração de paration metílico.

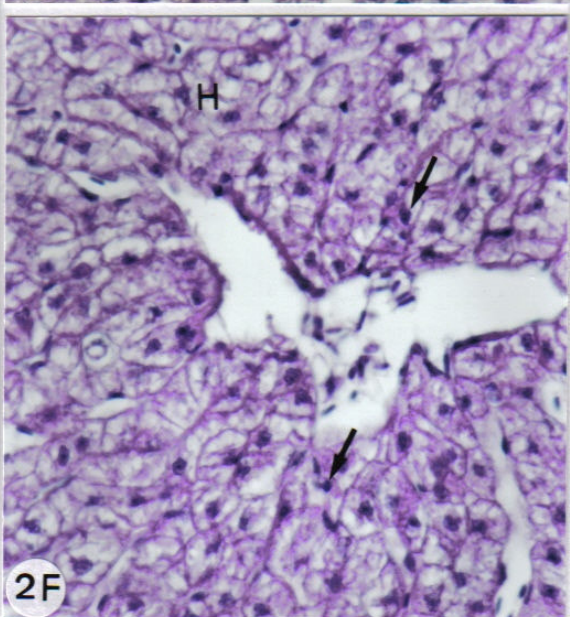
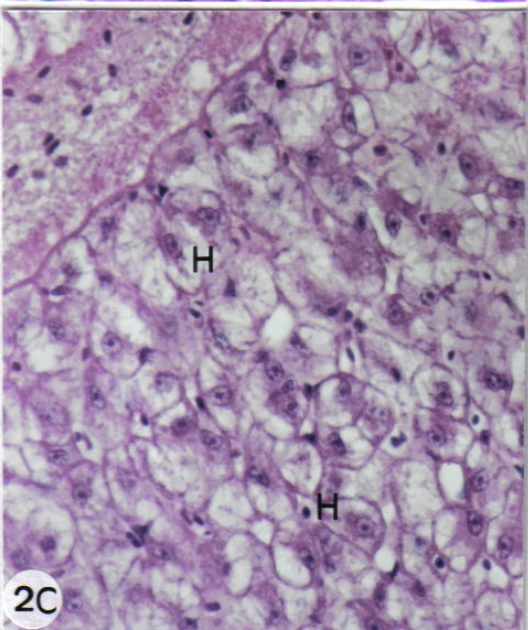
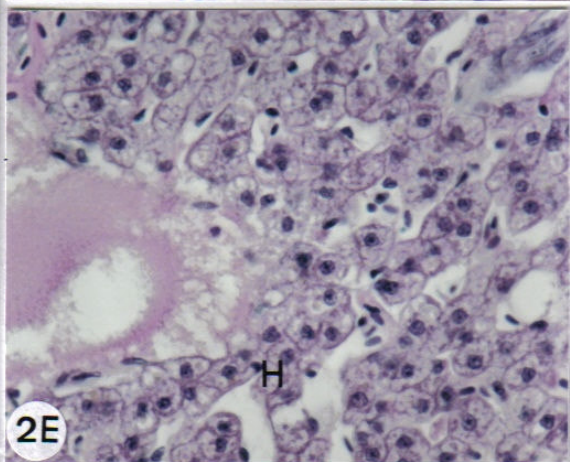
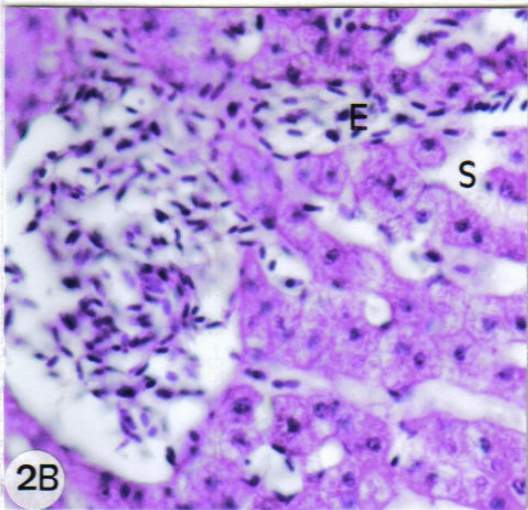
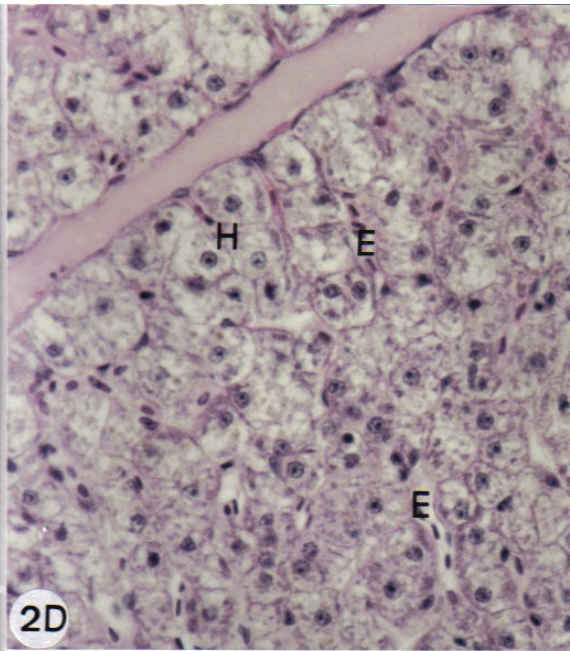
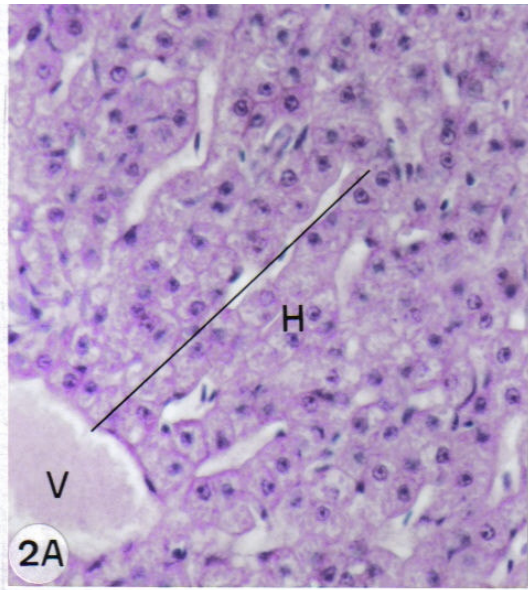


Figura 2. Fotomicrografia de fígado de pacu. **A.** Organização cordonal (traço) dos hepatócitos (H) e veia centrolobular (V) de alevinos no tratamento controle. H/E. 400x. **B.** Presença de congestão sangüínea (E) nos sinusóides (S) dos alevinos expostos a 2,5 mg de paration metílico/L. H/E. 400x. **C.** Hipertrofia dos hepatócitos (H) de jovens de pacu expostos a 10,5 mg de paration metílico/L. H/E. 400x. **D.** Presença de congestão sangüínea (E) e desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos (H) de alevinos expostos a 5,0 e 7,5 mg de paration metílico ou a 1,18 mg de azadiractina/L. H/E. 400x. **E.** Desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos (H) de jovens expostos a 1,18 mg de azadiractina/L. H/E. 400x. **F.** Desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos (H) e picnose nuclear (seta) de jovens expostos a 12 mg de paration metílico/L. H/E. 400x.

4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro: Processos: 142151/2001-7 (bolsa de doutorado do primeiro autor) e 477882/2003-0 (edital universal 2002).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSARI, B.A. e KUMAR, K. Malathiom toxicity: pathological changes in the liver of zebrafish, *Brachidanio rerio* (Cyprinidae). **Bol. Fisiol. Anim. Univ. S. Paulo.** v. 11. p. 27-34, 1987a.
- ANSARI, B.A. e KUMAR, K. Malathiom toxicity: effect on ovary of zebrafish *Brachidanio rerio* (Cyprinidae). **Int. Rev. Ges. Hydrobiol.** v. 72, p. 517, 528, 1987b.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington, Editora: American Public Health Association. 17ed. 1991, p. 81-143.
- BARNI, S. BERNOCCHI, G. GERZELI, G. Morphohistochemical changes in hepatocytes during the life cycle of the European eel. **Tissue & Cell.** v. 17, n. 1, p. 97-109, 1985b.
- BEHMER, A.O. TOLOSA, E.M.C. FERITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 1ª edição, Ed. Edusp/edart, 1976, 239p.
- BERNET, D. SCHMIDT, H. MEIER, W. BURHARDT-HOLM, P. WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish. Diseases.** v. 22, p. 25-34, 1999.

CETESB. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. Água – teste de toxicidade aguda com peixes – parte I – sistema estático.** São Paulo. v. II, 1999, p. 1-29.

COUTH, J.A. Role of pathobiology in experimental marine biology and ecology. J. **Experim. Mar. Biol. Ecol.** v. 118, p. 1-6, 1988.

CENGIZ, E.I. e UNLU, E. Histopathological changes in the gills of mosquitofish *Gambusia affinis* exposed to endosulfan. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 68, p. 290-296, 2002.

DOMITROVIC, H.A. **Histologia e histopatologia de *Aequidens portalegrensis* (Hensel, 1870): 1. Morfologia normal y patologias naturales; 2. Ensayos com agentes terapêuticos y pesticidas.** (Tese-Doutorado), Universidad de Buenos Aires, FCV, 1997. 266p.

DUTTA, H.M. ADHIKARI, S. SINGH, N.K. ROY, P.K. MUNSHI, J. S.D. Histopathological changes induced by Malathion in the liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 51, p. 895-900, 1993.

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

FERNANDES, M.N. e PERNA-MARTINS, S.A. MORON, E. Chloride cell apical surface changes in gill epithelia of the armored catfish *Hypostomus plecostomus* during exposure to distilled water. **J. Fish. Biol.** v. 52, p. 884-849, 1998.

GILL, T.S. PLANT, J.C. PRANT, J. Gill, liver and kidney lesions associated with experimental exposures to carbaryl and dimethoate in fish *Puntius conchonius*. **Bull. Environ. Contamin. Toxicol.** v. 41, n.1 p. 71-78, 1988.

HASCHEY, W.M. e ROUSSEAU, C.G. **Handbook of toxicology pathology.** Academic Press. London. 1996, 127-151p.

IBAMA. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes. Parte D. 3. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos.** Brasília, DF, 1987.

JOBLING, S. e SUMPTER, J.P. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Aquatic. Toxicol.** v. 27, p. 361-372, 1993.

JOHNSON, L.L. STEHR, C.M. OLSON, O.P. MYERS, M.S. PIERCE, S.M. WIGREN, C.A. McCAIN, B.B. VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Environ. Scienc. Technol.** v. 27, p. 2759-2771, 1993.

KRANZ, H. e DETHEFSEN, V. Liver anomalies in *Limanda limanda* from the southern North sea with special consideration given to neoplastic lesions. **Diseas. Aquat. Org.** v. 9, p. 171-185, 1990.

LARINI, L. **Toxicologia**. Editora: Manole. São Paulo, 1987. 315p.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v.42, p. 630-648, 1985.

McDOWEEL, E.M. e TRUMP, B.F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 100, p. 405-414, 1976.

MONTENEGRO, R.M. e FRANCO, M. **Patologia. Processos gerais**. Editora: Atheneu, 4^a ed. 320p. 1999.

MORRISON, R.N. NOWAK, B.F. CARSON. J. The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**. v. 195, p. 23-33, 2001.

MURTY, A.S. **Toxicology of pesticide to fish**. Boca Raton, Editora: CRC Press. 1988. v. 1, 129p.

NOGA, E.J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. Mosby, North Carolina State University, College of Veterinary Medicine, 1996, 367p.

PATWARDHAN, S.A. e GAIKWAD, S.A. Effect of sumithion on liver, hepatopacreas and mesenteric pacreas of freshwater fish *Gambusia affinis*. **Environ. Ecol.** v. 9, n. 2, p. 352-355, 1991.

RANDALL, D.J. BRAUNER, A.J. THUSTON, R.V. NEUMAN, J.F. Water chemistry at the gill surfaces of fish and the uptake of xenobiotics. In: Taylor, E.W. (ed). **Toxicology of Aquatic Pollution**. Cambridge University Press, London/New York. 1996. 1-16p.

RIBELLES, A. CARRASCO, M.C. ROSETY, M. ALDANA, M. Morphology and histochemical changes in the liver and pancreas of gilthead, *Sparus auratus* L., induced by acute action of the anionic detergent, sodium dodecyl sulphate. **Histol. Histopathol.** v. 10, p. 781-787, 1995.

RICHMONDS, C. e DUTTA, H.M. Histopathological changes induced by Malathion in gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. **Bull. Env. Contam. Toxicol.** v. 43, p. 123-130, 1989.

RODRIGUES, E.L. e FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydario rerio* after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimetoato 500. **Rev. Bras. Zool.** v. 15, p. 441-450, 1998.

ROMBOUGH, P.J e GARSIDE, E.T. Hypoxial death inferred form thermally induced injuries at upper lethal temperatures, in the banded killifish. *Fundulus diaphanous*. **Can. J. Zool.** v. 55, p. 1705-1719, 1977.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture for South American fish: a review. **Aquaculture.** v. 54. p. 205-240, 1986.

SARAVANA, P. e GERALDINE, B.P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. **Aquatic. Toxicol.** v. 50, p. 331-339, 2000.

SCHAAF, O. JARVIS, A.P. ESCH, A.V.D. GIAGNACOVO, G. OLDHAM, N.J. Rapid and sensitive analysis of azadachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **J. Chromat. A.** v. 886, p. 89-97, 2000.

SENHORINI, J.A. FONTES, N.A. LUCAS, A. F.B. SANTOS JR, S. Larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Pisces, Characidae) em viveiros com e sem organofosforado (folidol 60%). **Bol. Tec. CEPTA.** n. 2, p.11-22, 1991.

SEVERI, W. RANTIN, F.T. FERNANDES, M.N. Structural and morphology features of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) gills. **Rev. Brasil. Biol.** v. 60, n. 3, p. 493-501, 2000.

SILVA, H.C. MEDINA, H.S.G. FANTA, E. BACILA, M. Sublethal effects of the organophosphate Folidol 600 (methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Telestei). **Comp. Biochem. Physiol. C.** v. 105 n. 2. p.197-201, 1993.

SINDERMANN, C.J. An examination of relationships between pollution an disease. **Rapport de la Renion du Conseil International pour l'Explortion des Mers.** v. 182, p. 37-43, 1983.

SHEPHARD, K.L. **Functions for fish mucus. Review in fish biology and fisheries.** v. 4, p. 401-429, 1994.

SKIMORE J.F. e TOVELL, P.W.A. Toxic effects of zinc sulfate on the gills of rainbow trout. **Wat. Res.** v. 6, p. 217-230, 1972.

SOUZA, V.L. LUNARDI, L.O. VASQUES, L.H. CASALETI, L. NAKAGHI, L.S.O. URBINATI, E.C. Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) during food restriction and refeeding. **Bras. J. Morphol. Sci.** v. 18, n. 1, p. 15-20, 2001.

SPEARE, D.J. ARSENAULT, G. MACNAIR, N. POWELL, M.D. Branchial lesions associated with intermittent formalin bath treatment of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Fish. Diseases.** v. 20, p. 27-33, 1997.

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

ZODROW, J.M. STEGEMAN, J.J. TANGUAY, R.L. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8, - tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in zebrafish. **Aquatic. Toxicol.** v. 66, p. 25-38, 2004.

Eficácia do inseticida paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea) em *Piaractus mesopotamicus**

Claudinei da Cruz¹, Joaquim Gonçalves Machado Neto¹, Rodrigo Yudi Fujimoto²

¹Laboratório de Ecotoxicologia dos Agrotóxicos e Saúde Ocupacional, do Departamento de Fitossanidade da UNESP - Câmpus de Jaboticabal e Centro de Aqüicultura da UNESP/CAUNESP, Câmpus de Jaboticabal.

²Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto.

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP - Câmpus de Jaboticabal.
Departamento de Fitossanidade.

Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14870-000.

Jaboticabal, São Paulo.

E-mail: joaquim@fcav.unesp.br

* Artigo formatado segundo a norma do Journal of Fish Diseases

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia do inseticida paration metílico e do pesticida natural azadiractina contido no extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN) no controle do *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). A eficácia do paration metílico foi avaliada em um experimento com seis tratamentos (0,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; e 7,0 mg de paration metílico/L de água) e cinco tempos de exposição (2; 4; 8; 16; e 24h). A eficácia da azadiractina contida no

EAFSN foi avaliada em um experimento com sete tratamentos (0,0; 0,29; 0,59; 0,88; 1,18; 1,47; e 2,9 mg de azadiractina/L de água) e cinco tempos de exposição (24; 48; 72; 96; e 120h). A eficácia do paration metílico foi maior com o aumento da concentração e do tempo de exposição. No tratamento com 7 mg/L de paration metílico ocorreu a maior eficácia de controle em todos os tempos de exposição. Neste tratamento, as maiores eficácias ocorreram nos tempos de 16 e 24 horas de exposição, com 96,2 e 97,0 % de controle. Para o EAFSN, a maior eficácia de controle (89,2 %) foi com a concentração de 2,9 mg/L, após 120h de exposição. A eficácia nos tratamentos com 1,47 mg/L foi de 83,9 % de controle e com 1,18 mg/L, 82,5 % após 120h de exposição. O paration metílico apresentou maior eficácia de controle do *A. penilabiatus* que o EAFSN. O EAFSN foi moderadamente efetivo no controle do parasito. O tempo de exposição para se obter eficácia do EAFSN foi de 120 horas, o que pode inviabilizar a sua utilização em tratamentos terapêuticos. Com o paration metílico tem-se diferentes possibilidades de tratamento, sendo possível a sua utilização tanto na profilaxia quanto na terapêutica.

Palavras Chaves: *Piaractus mesopotamicus*, tratamento, eficácia, parasitos, paration metílico, nim.

ABSTRACT

The this work determined the efficacy of the insecticide methyl parathion and the natural pesticide azadirachtin present in the aqueous extract of dry neem leaves (AEDNL) in the control *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea) in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). The efficacy of methyl parathion was evaluated in an experiment consisting of six treatments (0.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 mg methyl parathion/L water) and five exposure times (2, 4, 8, 16 and 24 h). The efficacy of azadirachtin present in AEDNL was assessed in an experiment consisting of seven treatments (0.0, 0.29, 0.59,

0.88, 1.18, 1.47 and 2.9 mg azadirachtin/L water) and five exposure times (24, 48, 72, 96 and 120 h). The efficacy of methyl parathion increased with increasing concentration and exposure time. The highest control efficacy was obtained with a concentration of 7 mg methyl parathion/L at all exposure times. In this treatment, the highest efficacies were observed at 16 and 24 h of exposure, with a control rate of 96.2 and 97.0%, respectively. For the AEDNL, the highest control efficacy (89.2%) was obtained with a concentration of 2.9 mg/L after 120 h of exposure. The efficacy in the treatments employing 1.47 and 1.18 mg/L was 83.9 and 82.5%, respectively, after 120 h of exposure. Methyl parathion presented a higher efficacy in the control of *A. penilabiatus* than the AEDNL. The AEDNL was moderately effective in the control of the parasite. The exposure time necessary for AEDNL to become effective was 120 h, a fact that might impair its use in therapeutic treatments. Methyl parathion offers different treatment possibilities, including both prophylaxis and therapy.

Key words: *Piaractus mesopotamicus*, treatment, efficacy, parasites, methyl parathion, neem.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da produtividade aquícola ocorrida nos últimos anos no país, devido ao desenvolvimento de novas tecnologias de produção, resultou no aparecimento de muitas enfermidades nos peixes. Estas enfermidades ocorrem devido ao regime de cultivo intensivo com alta densidade populacional que provoca estresse nos animais, tratamentos químicos, transporte, reprodução artificial e degradação da qualidade de água (PAVANELLI et al. 1998).

Em criações intensivas os microrganismos se proliferam rapidamente (ROBERTS e BULLOCK, 1980). Isto ocorre devido à má qualidade da água de cultivo e

a não execução de medidas preventivas na introdução de novos peixes nos criatórios ou pelo contato dos animais de cultivo com peixes silvestres parasitados (THATCHER e BRITES-NETO, 1994; MARTINS, 1998).

Os parasitos monogenéticos estão entre os patógenos de maior ocorrência e frequência na piscicultura brasileira. São ectoparasitos do grupo dos platelmintos, caracterizados pela presença de aparelho de fixação localizado na parte posterior do corpo. Os adultos possuem forma alongada, ovoidal ou circular e medem de um milímetro a três centímetros. O prejuízo causado nos peixes está relacionado com a espécie, local da infestação, tipo de alimentação dos parasitos e com a carga parasitária do peixe (PAVANELLI et al. 1998). Pertencem a um táxon que apresenta grande diversidade, não somente em número, como também em morfologia e ecologia. Atualmente são conhecidas 462 espécies da família Dactylogyridae, que inclui a espécie *Anacanthorus penilabiatus* (POULIN, 2002).

Segundo KOHN et al. (1985), em levantamento realizado em 21 espécies de sete famílias de peixes, os monogenéticos ocorreram em 63,1 % dos animais avaliados. Em pisciculturas de *Piaractus mesopotamicus* e *Colossoma macropomum*, estes parasitos ocorreram em até 100 % dos animais (EIRAS et al. 1995). MARTINS e ROMERO (1996) constataram a ocorrência desses parasitos em até 58,0 % de peixes provenientes de pisciculturas. Existem vários relatos de ocorrência de infestação de monogenéticos em peixes: *Osteoglossum bicirrosom* (KRITSKY e BOEGER, 1983); *Anguilla anguilla* (CRUZ-SILVA et al. 1990/91); *Cyprinus carpio* (MOLNAR, 1994); *Salminus maxillosus* (BOEGER et al. 1995a); *Piaractus mesopotamicus* (BOEGER et al. 1995b; MARTINS, 1998), *Salmo salar* (APPLEBY e MO, 1997); e *Pimelodus maculatus* (GUTIERREZ e MARTORELLI, 1999).

Geralmente os monogenéticos que atacam as brânquias provocam hiperplasia do epitélio de revestimento, desprendimento do epitélio e ruptura de células pilares (MARTINS e ROMERO, 1996) e fusão das lamelas secundárias (THATCHER, 1991). Na infecção por monogenéticos ocorre ainda intensa produção de muco nas brânquias e superfície corporal dos peixes (EIRAS et al. 1995), anorexia, hemorragias cutâneas e nas brânquias, edema nos filamentos branquiais e perda de peso do animal (MARTINS, 1998).

Atualmente, muitos agentes químicos são empregados, de forma profilática ou terapêutica, na piscicultura para o controle de monogenéticos. Entre os agrotóxicos e outros produtos químicos destacam-se o mebendazol/triclorfon (GOVEN e AMEND, 1982), o paration metílico (NOGA, 1996), o bitionol (KIM e CHOI, 1998), o praziquantel e o levamisol (HIRAZAWA et al. 2000), a formalina e o verde malaquita (PIRONET e JONES, 2000), o mebendazol (MARTINS et al. 2001), triclorfon (STEPHENS et al. 2003), a formalina e o triclorfon (CECCHINI e COGNETTI-VARRIALE, 2003) e o praziquantel (HIRAZAWA et al. 2004).

Entre os produtos que podem apresentar grande eficiência no controle de patógenos e resultar em menor impacto no meio ambiente está o pesticida natural azadiractina. Este princípio ativo é natural e isolado da planta *Azadirachta indica* (Meliaceae) (SCHAAF et al. 2000). O nim apresenta efeitos antiinflamatórios, anti-reumáticos, antiartrítico, anti-pirético e anti-microbial (DEY, 1980).

O pacu (*P. mesopotamicus*) é uma espécie muito cultivada por apresentar carne saborosa, fácil obtenção de alevinos no mercado e ampla adaptação aos sistemas de cultivo. Entretanto, é uma espécie muito atacada pelas parasitoses, principalmente as ectoparasitoses, que são sendo controladas com o uso freqüente de substâncias químicas aplicadas diretamente nas águas. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia do inseticida paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim (EAFSN) baseado na concentração de azadiractina, no controle de parasitos monogenéticos *Anacanthorus penilabiatus* (Monogeneam, Dactylogyridae) em pacu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados peixes provenientes do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Os experimentos foram conduzidos na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

2.1. Contagem inicial do número de monogenéticos, determinação da eficácia e condições ambientais

A contagem inicial do número de monogenéticos foi realizada para se estimar a carga parasitária inicial presente nos peixes. Para tanto, foram amostrados 20 animais do total de animais que foram utilizados nos experimentos. Estes animais foram mortos por excesso de anestésico (benzocaína a 0,1 g/L). As brânquias foram coletadas e fixadas em formaldeído (1:4000; v/v) por 1 hora, para o distendimento do parasito. Após este procedimento, as brânquias foram refixadas em formaldeído a 10 %, por 24 horas. A contagem do número de parasitos presentes nas brânquias amostradas antes e depois do experimento foi realizada em estéreo microscópio de campo claro (Coleman[®]).

A determinação da eficácia de controle dos monogenéticos presentes nas brânquias foi calculada de acordo com fórmula do Guidelines for the Testing of Veterinary Medicinal Products (1994) e ONAKA (2001):

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

Onde:

Ef = eficácia do controle (%);

MTrat = média do número de parasitos nos grupos tratados;

Mcont = média do número de parasito no tratamento controle.

O nível de aceitabilidade de eficácia dos produtos testados foi de 90 ± 10 % de controle, de acordo com as normas da ANVISA (2004) para produtos desinfetantes e a classificação do MERCOSUL (2004).

As variáveis ambientais de temperatura, pH, amônia total, oxigênio dissolvido, turbidez e condutividade elétrica da água foram avaliadas em cada unidade experimental em cada tempo de coleta.

2.2. Eficácia do inseticida paration metílico no controle de *Anacanthorus penilabiatu*s

A determinação da eficácia no controle dos monogenéticos com paration metílico foi realizado em experimento com delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (6x5), sendo seis concentrações (0,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; e 7,0 mg de paration metílico/litro de água) e cinco tempos de exposição (2; 4; 8; 16; e 24 horas), com três repetições. Foram utilizados 10 animais por repetição pesando 100 ± 10 g, na

densidade de 16,6 g/L de água. As parcelas experimentais foram caixas plásticas com capacidade de 60 L, com aeração constante da água durante o período experimental.

2.3. Eficácia do EAFSN baseado na concentração de azadiractina no controle de *Anacanthorus penilabiatu*s

A determinação da eficácia no controle dos monogenéticos com o EAFSN foi realizada em experimento com o delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdividas (7x5), com sete concentrações (0,0; 25; 50; 75; 100; 125; e 150 mL de extrato aquoso de nim/L de água, equivalente a 0,0; 0,29; 0,59; 0,88; 1,18; 1,47; e 2,9 mg de azadiractina/L de água e cinco tempos de exposição (24; 48; 72; 96; e 120 horas), com três repetições. Foram utilizados 10 animais por repetição pesando $115,5 \pm 15$ g, na densidade de 19,1 g/L. As parcelas experimentais foram caixas plásticas com capacidade de 60 L, com aeração constante da água durante o período experimental.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número médio de parasitos monogenéticos na contagem inicial foi de 320 ± 23 parasitos/peixes. Número similar de parasitos também foi utilizado por HIRAZAWA et al. (2000) para avaliação de eficácia de anti-helmíntico. O número de parasitos obtidos na contagem inicial pode ser considerado como uma infestação parasitária muito elevada (MARTINS, 1998).

Durante o experimento de eficácia do paration metílico para o controle dos parasitos monogenéticos a temperatura da água permaneceu entre 25,5 e 26,5 °C. O aumento da concentração do paration metílico provocou aumento na condutividade elétrica da água e diminuição no oxigênio dissolvido e no pH da água (Figura. 1). SOLENG et al. (1999) verificaram que a diminuição do pH da água em associação com solução aquosa de alumínio reduziu a infestação de *Gyrodactylus salaris* no salmão do atlântico, indicando que esta espécie de parasito monogenético é sensível presença do íon H^+ na água.

A turbidez da água aumentou após 16 e 24 horas de exposição em todos os tratamentos com paration metílico (Figura. 1). A concentração de amônia total (NH_3^+)

aumentou nos tratamentos com 4, 5, 6 e 7 mg paration metílico/L, com valores variando de 263 a 415 µg/L. Nos tratamentos controle e com 3 mg/L foram observados as menores concentrações de amônia total na água, com médias de 189 e de 216 µg/L, respectivamente (Figura. 2).

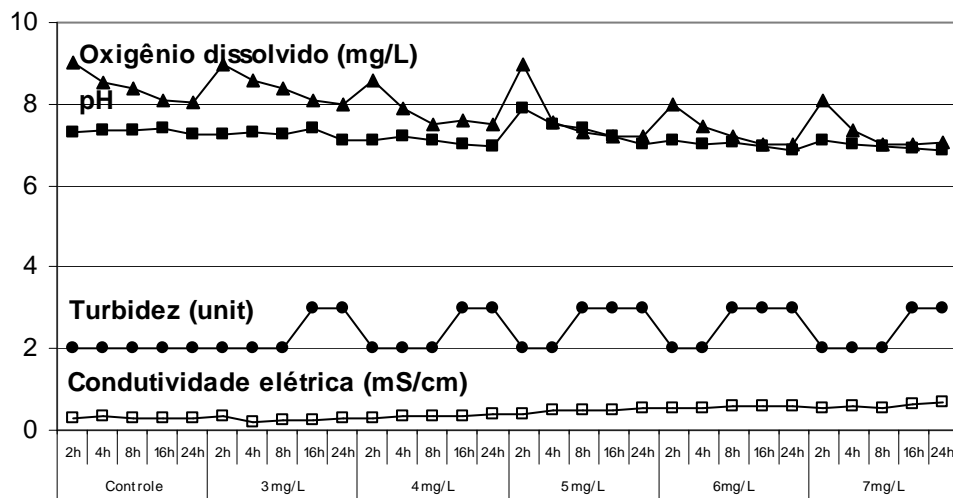


Figura 1. Características de qualidade de água durante a determinação da eficácia do paration metílico no controle de *A. penilabiatu*s.

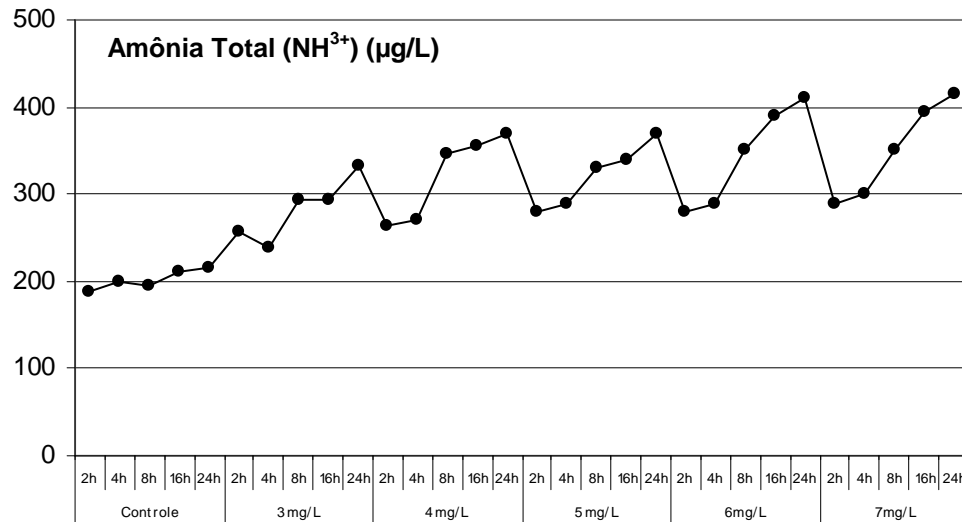


Figura 2. Variação da amônia total durante a determinação da eficácia do parition metílico no controle de *A. penilabiatu*s.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados dos efeitos dos fatores concentração e tempo de exposição ao parition metílico. Verifica-se que ocorreu interação significativa entre estes dois fatores. A eficácia do parition metílico foi maior com o aumento da concentração e do tempo de exposição.

A maior eficácia de controle em todos os tempos de exposição foi na concentração com 7 mg de parition metílico/L, que não diferiu significativamente entre os tempos de exposição. Neste tratamento, as maiores eficácias ocorreram nos tempos 16 e 24 horas de exposição, com 96,2 e 97,0 % de controle, respectivamente (Figura 3). A partir de 4 horas de exposição, o tratamento com 6 mg/L também apresentou eficácia de controle (88,6 %) dos parasitas monogenéticos. Neste tratamento não ocorreu diferenças significativas entre os tempos de exposição de 4, 8, 16 e 24 horas, com o número médio de parasitos variando de 37,2, em 4h de exposição para 12,7 em 24h (Tabela. 1). A eficácia nesta concentração variou de 91,7 a 96,0 % (Figura. 3).

Nos tratamentos com 4 e 5 mg/L verificou-se as maiores eficácias (94,0 e 96,2 %) nos tempos de 16 e 24 horas de exposição. Não ocorreu diferença nestes tempos de exposição em relação aos tratamentos com 6 e 7 mg/L. O tratamento com 3 mg/L

de paration metílico foi o mais eficaz (88,7 %) no controle de *A. penilabiatatus* apenas após 24 horas de exposição (Figura. 3).

Um produto técnico anti-helmíntico, em teste para a sua comercialização, deve apresentar eficácia acima de 80 % (MERCOSUL, 2004). O paration metílico apresentou excelente eficácia acima de 90 % no controle de *A. penilabiatatus*, nas concentrações de 6,0 e 7,0 mg/L nos tempos de exposição de 8, 16 e 24h e de 94 a 96 % na concentração 5,0 mg/L nos tempos de 16 e 24h. Portanto, estes tratamentos podem ser classificados como eficientes no controle do *A. penilabiatatus* em pacu, de acordo com os critérios de aceitabilidade de controle estabelecidos na norma de teste de eficácia do MERCOSUL (2004).

As concentrações de 6,0 e 7,0 mg/L também atendem ao critério de aceitabilidade de eficácia para produtos desinfetantes para o controle de organismos alvos estabelecidos pela ANVISA (2004), que é de 90 ± 10 % de controle, como foi constatado para o paration metílico.

Tabela 1. Número médio, desvio padrão e valores de F para número de *A. penilabiatatus* em *P. mesopotamicus*, após o tratamento com paration metílico.

Tempo	Concentração de paration metílico (mg/L)						F
	0,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	
2h	328 Aa ± 26	114,2 Ab ± 13	90,2 Abc ± 12	74,7 Ac ± 11	70,0 Ac ± 14	35,2 Ad ± 8,7	248,77**
4h	327 Aa ± 22	113,7 Ab ± 12	50,5 Bc ± 20	58,7 Ac ± 26	37,2 Bc ± 15	31,5 Ac ± 7,1	285,53**
8h	329 Aa ± 15	70,5 Bb ± 11	51,5 Bbc ± 6,2	51,5 Abc ± 10	27,2 Bc ± 0,9	30,0 Ac ± 11	301,03**
16h	325 Aa ± 14	62,0 Bcb ± 25	19,7 Cc ± 8,9	19,2 Bc ± 11	12,7 Bc ± 5,3	12,2 Ac ± 2,6	341,26**
24h	325 Aa ± 3,6	36,7 Cb ± 3,9	15,7 Cb ± 6,3	12,2 Bb ± 6,4	12,7 Bb ± 6,0	9,5 Ab ± 1,7	352,10**
F	0,68 ^{ns}	25,45**	20,00**	15,71**	12,91**	3,13*	4,27**

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais comparadas nas colunas e letras minúsculas iguais comparadas nas linhas não diferenciam entre si pelo teste de Tukey. ** significativo em nível de 1 % de probabilidade; * significativo em nível de 5 % de probabilidade e ^{ns} não significativo.

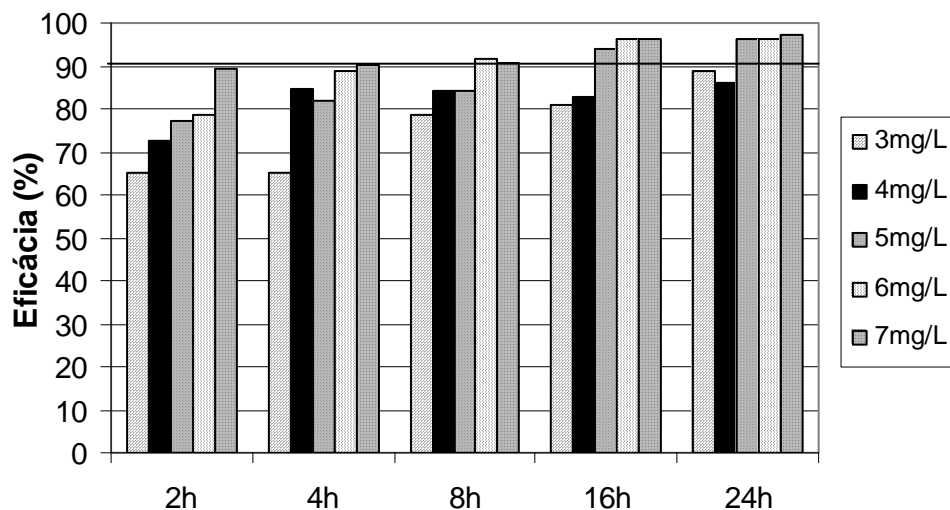


Figura 3. Eficácia dos tratamentos com paration metílico no controle do *A. penilabiatus* em pacu. (– 90 ± 10 %) nível de aceitabilidade de eficácia estabelecido pela ANVISA (2004).

Na Figura 4 verifica-se que o aumento das concentrações e dos tempos de exposição à azadiractina contida no EAFSN provocou diminuições no pH da água, que variou de 7,37 no tratamento controle para 6,70 no tratamento com 2,9 mg/L de azadiractin, após 120 h. A concentração de oxigênio dissolvido também diminuiu com o aumento da concentração e do tempo de exposição. Por outro lado, os valores de condutividade elétrica e de turbidez da água aumentaram com os aumentos das concentrações e dos tempos de exposição (Figura. 4). A concentração da amônia total (NH_3^+) na água também aumentou em todas as concentrações de azadiractina, variando de 239 $\mu\text{g/L}$ no tratamento com 0,29 mg/L, para 650 $\mu\text{g/L}$ no tratamento com 2,9 mg/L, após 120 horas de experimento (Figura. 5). Porém, estes valores físico-químicos das águas experimentais ainda estão dentro dos valores preconizados para a criação desta espécie em cativeiro.