



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, BIOQUÍMICA, HISTO-HEMATOLÓGICA E
EFICÁCIA DE TERAPÊUTICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PACU,
*PIARACTUS MESOPOTAMICUS***

Bióloga: Cynthia Venâncio Ikefuti

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

Jaboticabal – São Paulo

2016

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA, BIOQUÍMICA, HISTO-HEMATOLÓGICA E
EFICÁCIA DE TERAPÊUTICOS NO CONTROLE DE DOENÇAS EM PACU,
*PIARACTUS MESOPOTAMICUS***

Bióloga: Cynthia Venâncio Ikefuti

Orientadora: Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva

Corientador: Prof. Dr. Claudinei da Cruz

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

Jaboticabal – São Paulo

2016

Dedico

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

**Tudo o que temos de decidir é o que fazer com tempo que nos é dado.
(J. R. R. Tokien – O Senhor dos Anéis).**

Agradecimentos

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

Ao meu pai Kazuo Ikefuti, minha mãe Ivone Venâncio Ikefuti, meu filho Caio Henrique Ikefuti de Castro, minhas irmãs Michelle e Priscilla V. Ikefuti, pela confiança em mim depositada e pelo apoio nas horas mais difíceis.

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

Ao meu corientador, Dr. Claudinei da Cruz, por me auxiliar durante todo esse caminho que eu percorri, por me ensinar a definição de equipe e a importância da rotina em um laboratório.

Aos companheiros de trabalho do Núcleo de estudos e pesquisas ambientais e matologia (NEPEAM): Adilson, Alessandro, Alfredo, Ana Cristina, Guilherme, Mayara, Natália Aike, Natália R, Nathalia, Roberto, Ronaldo, Sâmela, Silvia Patrícia, Taise, Wilson. Saibam que eu não conseguiria sem vocês. Muito obrigada pessoal.

Ao Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli e à Profa Márcia Machado pela disponibilização da estrutura de seus respectivos laboratórios.

Ao meu amigo e namorado Alfredo Kohiti Feres Yamauchi, pelos conselhos, conversas, paciência e compreensão nos momentos cruciais do meu trabalho.

Aos queridos: Felipe, Naiara, Marina, Bruno, Bruna, Steffan, Rafael, Dárcio e Michelle. Obrigada pela amizade, conselhos, brincadeiras, broncas. Por me ouvir e me aconselhar nos momentos de dúvida e por me alegrar e me confortar nos momentos de tristeza.

Aos companheiros de república Bruno, Fabiana, Mariana, Nadime e Thais, pelos momentos de descontração e conversas.

Aos funcionários do Caunesp, David, Veralice Valdecir, Donizeti e Márcios (da tilapicultura e ranicultura) por me ajudarem sempre que eu precisei.

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

Este projeto foi financiado pela CAPES na forma de bolsa de estudo de doutoramento.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de Tabelas.....	viii
Índice de Figuras.....	x
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Objetivos.....	6
Referências Bibliográficas.....	7
Capítulo 1. SEGURANÇA AMBIENTAL DE POTENCIAIS DROGAS PARA USO NA AQUICULTURA PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS E BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS EM PACU, <i>Piaractus mesopotamicus</i>	10
Resumo	10
1. Introdução e Objetivos	11
2. Material de métodos	13
2.1 Toxicidade aguda para <i>Lemna minnor</i> e <i>Azolla caroliniana</i>	13
2.2 Toxicidade aguda para <i>Daphnia magna</i>	14
2.3 Toxicidade aguda para <i>Pomacea canaliculata</i> , <i>Brachydanio rerio</i> , <i>Hyphessobrycon eques</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> e <i>Piaractus mesopotamicus</i>	14
2.4 Análises histopatológicas em <i>Piaractus mesopotamicus</i>	15
3. Resultados	16
3.1 Ensaios de toxicidade aguda.....	16
3.2 Análises histopatológicas em brânquias, fígado e rins de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	16
4. Discussão	17
5. Conclusão	20
6. Referências Bibliográficas	20
7. Tabelas e Figuras	26
Capítulo 2. EFICÁCIA DE CONTROLE DE <i>Anacanthorus penilabiatus</i> COM IMIDACLOPRID E RESPOSTAS HEMATOIMUNOLÓGICAS DE	29

***Piaractus mesopotamicus* DURANTE O TRATAMENTO E RECUPERAÇÃO**

Resumo	29
1. Introdução e Objetivos	30
2. Material e Métodos	31
2.1. Infestação experimental, eficácia e recuperação de <i>Piaractus mesopotamicus</i> infestados com <i>Anacanthorus penilabiatus</i>	31
2.2. Variáveis hematológicas, bioquímicas e osmo-iônicas.....	33
2.3 Resposta imune inata.....	34
3. Resultados	34
3.1 Eficácia do imidacloprid no controle de <i>Anacanthorus penilabiatus</i>	34
3.2. Variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata após o experimento de eficácia.....	35
3.3. Variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata após o experimento de recuperação.....	36
4. Discussão	38
5. Conclusão	40
6. Referências Bibliográficas	40
Capítulo 3. RESPOSTAS HEMATOIMUNOLÓGICAS DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> INFECTADOS COM <i>Aeromonas hydrophila</i> E TRATADOS COM ASSOCIAÇÃO DE SULFADIMETOXINA E METRONIDAZOL	46
Resumo	46
1. Introdução e Objetivos	47
2. Material e métodos	48
2.1. Infecção experimental e eficácia de <i>Piaractus mesopotamicus</i> infectados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	49
2.2. Reisolamento de <i>Aeromonas</i> sp.....	50
2.3. Variáveis hematológicas, bioquímicas e osmo-iônicas.....	51
2.4. Resposta imune inata e glicemia.....	52
3. Resultados	53
3.1. Eficácia da sulfadimetoxina + metronidazol e variáveis físicas e químicas da água.....	53
3.2. Variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata após	54

o experimento de eficácia.....	
3.3. Variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata após o experimento de recuperação.....	55
4. Discussão.....	57
5. Conclusão.....	58
6. Referências Bibliográficas.....	59
Capítulo 4. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> INFECTADOS COM <i>Anacanthorus penilabiatus</i> E <i>Aeromonas hydrophila</i>, TRATADOS COM FÁRMACOS E RECUPERADOS.	64
Resumo.....	64
1. Introdução e Objetivos.....	65
2. Material de métodos.....	66
2.1. Eficácia e recuperação do Imidacloprid em <i>Piaractus mesopotamicus</i> infestados com <i>Anacanthorus penilabiatus</i>	67
2.2. Eficácia e recuperação da sulfadimetoxina + metronidazol em <i>Piaractus mesopotamicus</i> infectados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	68
2.3. Análises histopatológicas em <i>Piaractus mesopotamicus</i>	69
3. Resultados.....	69
4. Discussão.....	71
5. Conclusão.....	75
6. Referências Bibliográficas.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84

ÍNDICE DE TABELA

Capítulo 1. SEGURANÇA AMBIENTAL DE POTÊNCIAIS DROGAS PARA USO NA AQUICULTURA PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS E BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS EM PACU, *Piaractus mesopotamicus*.....

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas dos ensaios de toxicidade aguda do IMD e do SM para <i>P. canaliculata</i> , <i>B. rerio</i> , <i>H. eques</i> , <i>O. niloticus</i> e <i>P. mesopotamicus</i>	26
--	-----------

Tabela 2. Valores de CE e CL50 de antibióticos e ectoparasitocidas para organismos não alvos.....	27
--	-----------

Capítulo 2. EFICÁCIA DE CONTROLE DE *Anacanthorus penilabiatu* COM IMIDACLOPRID E RESPOSTAS HEMATOIMUNOLÓGICAS DE *Piaractus mesopotamicus* DURANTE O TRATAMENTO E RECUPERAÇÃO.....

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão do número de parasitos amostrados, eficácia e sobrevivência nos experimentos preliminares de eficácia do imidacloprid em pacu, <i>P. mesopotamicus</i>	32
--	-----------

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão do número de parasitos amostrados, eficácia e sobrevivência no experimento definitivo de eficácia do imidacloprid em pacu, <i>P. mesopotamicus</i>	35
--	-----------

Tabela 3. Valores das variáveis sanguíneas da série vermelha e branca de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de eficácia do imidacloprid...	36
--	-----------

Tabela 4. Valores das variáveis séricas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de eficácia do imidacloprid.....	36
--	-----------

Tabela 5. Valores das variáveis sanguíneas da série vermelha e branca de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de recuperação do imidacloprid.....	37
---	-----------

Tabela 6. Valores das variáveis séricas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de recuperação do imidacloprid.....	37
---	-----------

Capítulo 3. RESPOSTAS HEMATOIMUNOLÓGICAS DE *Piaractus mesopotamicus* INFECTADOS COM *Aeromonas hydrophila* E TRATADOS COM ASSOCIAÇÃO DE SULFADIMETOXINA E METRONIDAZOL.....

Tabela 1. Valor total, eficácia e valores médios e desvio padrão de unidades formadoras de colônias (UFC) reisoladas de rim, fígado e baço de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de eficácia da SM....	53
--	-----------

Tabela 2. Valores das variáveis sanguíneas da série vermelha e branca de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de eficácia da SM.....	54
--	-----------

Tabela 3. Valores das variáveis, séricas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de eficácia da SM.....	55
---	-----------

Tabela 4. Valores das variáveis sanguíneas da série vermelha e branca de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de recuperação da SM.....	56
Tabela 5. Valores das variáveis séricas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata de pacu, <i>P. mesopotamicus</i> no final do experimento de recuperação da SM.....	56
Capítulo 4. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS DE <i>Piaractus mesopotamicus</i> INFECTADOS COM <i>Anacanthorus penilabiatus</i> E <i>Aeromonas hydrophila</i>, TRATADOS COM FÁRMACOS E RECUPERADOS.....	
Tabela 1. Respostas histopatológicas observadas em brânquias de <i>P. mesopotamicus</i> nos experimentos de eficácia e recuperação com o inseticida imidacloprid e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol.....	70
Tabela 2. Respostas histopatológicas observadas em fígado de <i>P. mesopotamicus</i> nos experimentos de eficácia e recuperação com o inseticida imidacloprid e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol.....	71
Tabela 3. Respostas histopatológicas observadas em rins de <i>P. mesopotamicus</i> nos experimentos de eficácia e recuperação com o inseticida imidacloprid e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol.....	71

ÍNDICE DE FIGURA

Capítulo 1. SEGURANÇA AMBIENTAL DE POTÊNCIAIS DROGAS PARA USO NA AQUICULTURA PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS E BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS EM PACU, *Piaractus mesopotamicus*.....

Figura 1. Fotomicrografia de brânquias (A, B, C, D) fígado (E, F, G) e rins (H) de pacu. **A.** LP: Lamela primária, Setas: Lamelas secundárias. **B.** IMD 100 mg L⁻¹. Seta: aumento do epitélio interlamelar. Estrela: ondulação das lamelas secundárias. **C.** LP: Lamela primária, Setas: Lamelas secundárias. **D.** SM 100 mg L⁻¹. Seta: aumento do epitélio interlamelar. Estrela: estase das lamelas secundárias. **E.** Controle. VL: Veia Lobular; Seta: Capilar Sinusóide; Linha: Arranjo cordonal dos hepatócitos **F.** IMD 100 mg L⁻¹. Seta vermelha: hipertrofia. Seta preta: núcleo deslocado para a periferia. **G.** SM 100 mg L⁻¹. Asterisco: congestão dos capilares sinusóides. **H.** TD: Túbulo Distal; TP: Túbulo Proximal; GL: Glomérulo. Asterisco: Cento de melanomacrófado. Fotomicrografias A e B. Aumento de 20X, barra de 25,0 µm. Fotomicrografia restantes. Aumento de 40X, barra de 12,5 µm. Coloração Azul de metileno.....

28

Capítulo 4. BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS DE *Piaractus mesopotamicus* INFECTADOS COM *Anacanthorus penilabiatu* E *Aeromonas hydrophila*, TRATADOS COM FÁRMACOS E RECUPERADOS.....

Figura 1. Fotomicrografias de brânquias de pacu. **A.** LP: Lamela primária, LS: Lamela secundária (seta vermelha). **B.** Estrela vermelha: ondulação das lamelas secundárias. **C.** Estrela preta: parasito. **D.** Asterisco vermelho: aumento do epitélio interlamelar. **E.** Asterisco preto: edema. **F.** Seta preta: congestão da lamela secundária. Aumento de 40X, barra de 1,0 cm = 12,5 µm. Coloração Hematoxilina e Eosina.....

82

Figura 2. Fotomicrografias de fígado (A, B, C) e rins (D, E, F) de pacu. **A.** VL: Veia Lobular; Seta: Capilar Sinusóide; Linha: Arranjo cordonal dos hepatócitos. **B.** Asterisco vermelho: Congestão dos capilares sinusóides; Seta preta: Hipertrofia dos hepatócitos com núcleo deslocado para a periferia **C.** Asterisco preto: aumento do diâmetro do capilar sinusóide. **D.** Controle TD: Túbulo Distal; TP: Túbulo Proximal; GL: Glomérulo; Seta vermelha: Cento de melanomacrófago **E.** Asterisco vermelho: Vacuolização dos túbulos; Estrela preta: Retração do glomérulo. **F.** Estrela vermelha: oclusão dos túbulos. Aumento de 40X, barra de 1,0 cm = 12,5 µm. Coloração Hematoxilina e Eosina.....

83

RESUMO

Objetivou-se com este estudo foram estimar os valores de concentração letal e efetiva (CE50 e CL50) do imidacloprid (IMD) e da associação de sulfadimetoxina e metronidazol (SM) para oito organismos aquáticos não alvos; avaliar o efeito histopatológico da exposição aguda do IMD e da SM em brânquias, fígado e rins de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Ajustar a dose, verificar a eficácia, a recuperação (14 dias) do IMD e da SM de pacus infestados/infectados experimentalmente com *Anacanthorus penilabiatu*s e *Aeromonas hydrophila* pelo monitoramento das variáveis físicas e químicas da água e das alterações histopatológicas, hematológicas, bioquímicas e imunológicas. O valor de CE e CL50 para todos os organismos foi $>100,0 \text{ mg L}^{-1}$ e as drogas foram classificadas como praticamente não tóxicas para as oito espécies. Após cinco dias de tratamento com o IMD ocorreu redução significativa de 81,32% no número de parasitos e aumento do número de eritrócitos nos peixes tratados. Após 14 dias do final do tratamento, foi observada redução dos valores de hemoglobina e CHCM dos peixes expostos ao IMD. Com a SM ocorreu crescimento de UFCs somente nas amostras reisoladas dos peixes sadios e infectados não tratados. Também foi observada redução do número de eosinófilos de todos os tratamentos em relação ao controle e aumento dos íons Na^+ nos peixes infectados e tratamentos com SM. Após 14 dias ocorreu redução do burst respiratório dos peixes de todos os tratamentos em relação ao controle sadio. As alterações histopatológicas observadas neste estudo foram reversíveis. Os dois fármacos possuem potencial para registro na aquicultura brasileira, pois atenderam requisitos importantes como baixa toxicidade para organismos não alvos; redução significativa no número de monogenéticos *A. penilabiatu*s e inibição do crescimento da bactéria *A. hydrophila* presentes em pacus, causando alterações reversíveis em *P. mesopotamicus*.

Palavras chaves: Farmoquímico, tratamento, recuperação, análises complementares.

ABSTRACT

The aims of this research were to estimate the effective and lethal concentration (CE50 and CL50) of imidacloprid (IMD) and of the association between sulfadimethoxin and metronidazole (SM), on eight non-target aquatic organisms; to evaluate the histopathological effect of the acute exposure to IMD and SM in the gills, liver and kidneys from pacu fish, *Piaractus mesopotamicus*; to adjust the dose, verify the efficacy of IMD and SM exposure, and to assess the 14 days recovery of experimentally infested pacu fish with *Anacanthorus penilabiatus* and *Aeromonas hydrophila*, through the monitoring of the physical and chemical water variables and the histopathological, hematological, biochemical and immunological response of the fish. The CE and CL50 was above 100.0 mg L⁻¹ for all tested organisms, and the drugs were classified as practically non toxic. After five treatment days with IMD, a significant decrease in parasite count (81.32%) and the increase in erythrocyte number were observed. A reduction in hemoglobin and CHCM count was observed 14 days after the treatment, in the fish exposed to IMD. The SM exposure promoted UFC growth only in the reisolated samples from the healthy and in the non-treated infected fish. The reduction in eosinophils count occurred in all treatments, in comparison to the control. The exposure to SM promoted the increase of Na⁺ ions in the infected fish. After 14 days, the reduction of burst was observed in all treatments in comparison to the healthy control. All the histopathological responses observed in the present research were reversible. Both drugs displayed registry potential in Brazilian aquaculture, for reaching the key requirements, such as low toxicity in non-target organisms; significant reduction in the monogenean *A. penilabiatus*; growth inhibition of the bacteria *A. hydrophila* in *P. mesopotamicus*; and promoted reversible changes in the fish.

Keywords: Pharmacochemical, treatment, recovery, additional analysis.

INTRODUÇÃO

A produção intensiva de organismos aquáticos é caracterizada por práticas intensas de manejo, como o transporte e adensamento dos animais. Estes fatores aliados a mudanças na qualidade da água, temperatura e salinidade favorecem uma série situações estressantes aos peixes (Vidal et al. 2008).

Estes fatores aumentam a possibilidade de ocorrência de doenças causadas por parasitos e bactérias que fazem parte da microbiota dos peixes ou microflora da água (Ranzani-Paiva et al. 1997). Os surtos agudos de doenças foram identificados como a principal restrição para a produção aquícola (Yunxia et al. 2001), pois estes podem muitas vezes dizimar com estoques inteiros, exigindo descontaminação dos recursos e equipamentos (Pillay e Kutty 2005), sendo identificado como potencial fator limitante para o desenvolvimento econômico da aquicultura (Jansen et al. 2012).

Dentre os principais parasitos na aquicultura estão os monogenéticos, como o *Anacanthorus penilabiatus*. Estes pertencem ao filo Platyelminthes, classe Monogenea são ectoparasitos que se encontram nas brânquias, narinas e superfície corpórea dos hospedeiros. Calcula-se que há mais de 3.000 espécies de monogenéticos parasitos de peixes (Eiras, 1994). Apresentam alto grau de especificidade pelo hospedeiro, cerca de 84,1% são encontrados em uma única espécie, gênero ou família de peixe (Shulman, 1961). Em pisciculturas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) estes parasitos ocorreram em 100% dos animais (Eiras et al. 1995).

O principal sinal da infestação 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 com perda de peso do animal (Martins et al. 2000).

Dentre os patógenos, as bactérias do gênero *Aeromonas* são descritas como as mais patogênicas e possuem alta resistência às drogas mais utilizadas na aquicultura (Sarter et al. 2007). São agentes causadores de septicemia hemorrágica bacteriana e atingem uma vasta variedade de espécies de peixes continentais (Silva et al. 2012).

As bactérias do gênero *Aeromonas* provocam alterações como ruptura de pequenos vasos sanguíneos, lesões superficiais pequenas, descamação e despigmentação da epiderme, hemorragias na cabeça, boca, nadadeiras, víceras e brânquias, levando à anemia e à hiperventilação no opérculo. Outros sintomas são: a redução total ou parcial da alimentação, escurecimento da pele, natação errática, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia e morte (Dung et al. 2008).

A espécie de maior importância para piscicultura, por sua alta patogenicidade é a *Aeromonas hydrophila* (Nam e Joh, 2007). Essas bactérias são capazes de produzirem enzimas extracelulares e toxinas como proteases, citosinas e hemolisinas (Kozinska, 2007). Esta bactéria é um bastonete móvel Gram-negativo (Viswanatan et al. 2015) e sua manifestação está associada ao excesso de matéria orgânica na água e temperaturas acima de 28°C. É um patógeno oportunista, considerado invasor secundário, que causa infecção em peixes imunossuprimidos e/ou associa-se à infecção por outros patógenos, como no caso do protozoário ciliado *Epistylis* (Vieira, 2003).

A fim de evitar o surto de doenças parasitárias e bacterianas, os piscicultores utilizam determinados fármacos conhecidos para evitar a propagação de tais agentes patogênicos. Infelizmente, há uma escassez de medicamentos aprovados pelo governo para combater-los e, portanto, os estudos de sua eficácia de novos medicamentos, bem como a avaliação dos potenciais riscos ambientais e de saúde associados com estas novas drogas tornam-se imperativo para o contínuo desenvolvimento da aquicultura (Carraschi et al. 2014).

O Imidacloprid (1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine) (IMD) demonstra potencial na aquicultura para ser utilizado no controle de *A. penlabiatus*. Este inseticida que pertence à classe química dos neonicotinóides que interagem com receptores nicotinérgicos do sistema nervoso central, causando paralisia no inseto. É um dos inseticidas mais vendidos e mais utilizados no mundo e utilizado tanto na área agrícola quanto na veterinária (Nauen e Bretschneider, 2002).

A associação da sulfonamida sulfadimetoxina [4-amino-N-(2,6-dimetoxi-4-pyrimidinil)] com imidazól metronidazol [1: etil (2-hidroxi)-2-metil-5-nitroimidazol]

(SM) é utilizada para o tratamento de giardíase em cães e gatos. Esta associação de antimicrobianos possui potencial para ser utilizado na aquicultura no controle de bacterioses devido ao seu amplo espectro de ação, pois, enquanto a sulfadimetoxina age contra protozoários e bactérias patogênicas, o metronidazol atua preferencialmente contra protozoários ciliados (Cepav, 2015).

Todo fármaco, assim como o IMD e o SM, são moléculas sintetizadas para alterar algumas reações bioquímicas dos organismos alvos os quais se deseja controlar. No entanto, determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, causam efeito não somente no organismo-alvo, como também nos demais seres vivos do ambiente aquático (Albinati et al. 2007). O uso de um fármaco na aquicultura envolve muitos fatores que devem ser avaliados, pois este será utilizado de forma direta no ambiente. A etapa inicial do processo de avaliação da viabilidade deve ser a avaliação da toxicidade inerente do ingrediente ativo com espécies representativas de diferentes níveis tróficos.

Para avaliar os efeitos causados pela exposição de um fármaco em um ecossistema recomenda-se empregar no mínimo três espécies de bioindicadores de diferentes níveis da cadeia trófica, afim de se obter uma resposta de organismos sensíveis com diferentes metabolismos (Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Alguns organismos utilizados em ensaios de toxicidade aguda são: microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*), microcrustáceos (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*), equinoides (*Vibrio fischeri*), oligoquetas (*Eisenia foetida*), moluscos (*Pomacea canaliculata*), peixes (*Brachydanio rerio*, *Poecilia reticulata*, *Hyphessobrycon eques*, *Pimephales promelas*), macrófitas (*Lemna minor*) e bactérias (*Vibrio fischeri*), dentre outros (Costa et al. 2008).

Em ambientes aquáticos, os fármacos ocorrem em concentrações subletais, de maneira que alterações na morfofisiologia dos organismos aquáticos são mais frequentes do que surtos de mortalidade (Albinati et al. 2007). Estas alterações podem ser utilizadas como biomarcadores, que consistem em alterações biológicas relacionadas à exposição ou aos efeitos tóxicos de um xenobiótico (Au, 2004; Nogueira et al. 2011). Assim, as respostas hematológicas, histológicas, bioquímicas, imunológicas, de osmolaridade e íons plasmáticos fornecem um

quadro amplo dos efeitos tóxicos de poluentes ambientais e devem ser avaliadas para verificar o grau destas alterações e se elas são reversíveis ou não no organismo aquático a ser estudado.

O desenvolvimento da aquicultura depende da tomada de decisão sobre o tipo de fármaco a ser empregado e os possíveis riscos para a saúde ambiental e do consumidor. Assim, o desenvolvimento de protocolos de tratamento seguros para os peixes e para o ambiente, com baixa toxicidade e efeito residual no ambiente e na carne, de fácil aplicação para a utilização nas propriedades produtoras são imprescindíveis. Desta forma, são necessários estudos que possam demonstrar a eficácia de controle, a toxicidade, os possíveis efeitos sobre os organismos alvos e não alvos.

OBJETIVOS

Diante do exposto, os objetivos gerais deste estudo foram:

- i. Estimar a toxicidade aguda (concentração letal e efetiva - CE50/CL50) e calcular o risco de intoxicação ambiental do inseticida Imidacloprid e da associação de antimicrobianos Sulfadimetoxina + Metronidazol para as macrófitas aquáticas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*; o microcrustáceo *Daphnia magna*; o molusco *Pomacea canaliculata* e os peixes *Bachydanio rerio*, *Hyphessobrycon eques*, *Oreochromis niloticus* e *Piaractus mesopotamicus*;
- ii. Avaliar o efeito histopatológico da exposição aguda do IMD e da SM em brânquias, fígado e rins de pacu, *P. mesopotamicus*;
- iii. Verificar a eficácia do IMD e a recuperação (14 dias) de *P. mesopotamicus* infestados experimentalmente com o monogenético *A. penilabiatus* e tratados com inseticida imidacloprid pelo monitoramento das variáveis físicas e químicas da água, das alterações histopatológicas, hematológicas, bioquímicas, osmônicas e imunológicas;

- iv. Verificar a eficácia da SM e a recuperação (14 dias) de *P. mesotamicus* infectados experimentalmente com a bactéria *A. hydrophila* e tratados com a Sulfadimetoxina + Metronidazol pelo monitoramento das variáveis físicas e químicas da água, das alterações histopatológicas, hematológicas, bioquímicas, osmônicas e imunológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V. D., Santos, G. B., Lira, A. D. D., 2007. Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piaçu ("*Leporinus macrocephalus*"). Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 8(3): 184-192.
- Au, D. W. T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Marine Pollution Bulletin. 48(9): 817-834.
- Carraschi, S. P., Barbuio, R., Ikefuti, C. V., Florêncio, T., da Cruz, C., Ranzani-Paiva, M. J. T., 2014. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. Aquaculture. 431:124-128.
- CEPAV. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ). Giardacid, 2015. Disponível em <http://www.biocom.com.br/giardacid.htm>
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M., Espindola, E. L., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova. 31(7): 1820-1830.
- Dung, T. T., Ngoc, N. T. N., Thinh, N. Q., Thy, D. T. M., Tuan, N. A., Shinn, A., Crumlish, M., 2008. Common diseases of *Pangasius* catfish farmed in Viet Nam. Global Aquaculture Advocate, 11(4): 77-78.
- Eiras, J. C., 1994. Elementos de Ictioparasitologia. Porto: Fundação Eng. António Almeida. 339p.
- Eiras, J. C., Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Alexandrino, A. C., Eiras, A.C., 1995. Ectoparasites of semi intensively farmed tropical freshwater fish

Piaractus mesopotamicus, *Prochilodus lineatus* and *Colossoma macropomum* in Brazil. Bulletin European Association of Fish Pathology. 15:148-151.

Jansen, P. A., Kristoffersen, A. B., Viljugrein, H., Jimenez, D., Aldrin, M., Stien, A., 2012. Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 279: 2330–2338.

Kozinska, A., 2007. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. J. Fish Dis. 30: 293-301.

Magalhães, D. P., Ferrão Filho, A. S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Oecologia Brasiliensis. 12(3):355-381.

Martins, M. L., Moraes, F. R., Fujimoto, R. Y., Onaka, E. M., Nomura, D. T., Silva, C. A. H., Schalch, S. H. C., 2000. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes. A survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. Revista Brasileira Parasitologia Veterinária. 9(1): 23-28.

Nam, I.-Y., Joh, K., 2007. Rapid Detection of Virulence Factors of *Aeromonas* Isolated from a Trout Farm by Hexaplex-PCR. The Journal of Microbiology. 45(4): 297-304.

Nauen, R., Bretschneider, T., 2002. New modes of action of insecticides. Pesticides. Outlook. 12: 241–245.

Nogueira, D. J., de Castro, S. C., Vieira, R. C. A., de Sá, O. R., de Azevedo Santos, V. M., 2011. Utilização das brânquias de *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) (Siluriformes; Pimelodidae) como biomarcador de poluição no reservatório da UHE Marechal Mascarenhas de Moraes, Minas Gerais, Brasil. Biotemas. 24(3): 51-58.

Pillay, T. V. R., Kutty, M. N., 2005. Aquaculture: Principles and Practices, 2^a ed. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. 630p.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Campos, B. E. S., Eiras, A.C., 1997. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil*

platanus, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 14(2): 329-339.

Shulman, S. S., 1961. Specificity of fishes parasites. In: Dogiel, V. A., Petrushevski, G. K., Polyanski, Y. I. *Parasitology of fishes*. Leningrad: University Press. 116p.

Silva, B. C., Mouriño, J. L. P., Vieira, F. N., Jatobá, A., Seiffert, W. Q., Martins, M. L., 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* × *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*. 43(6): 908-916.

Vidal, L. V. O., Albinati, R. C. B., Albinati, A. C. L., Lira, A. D. D., Almeida, T. D., Santos, G. B., 2008. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43(8): 1069-1074.

Vieira, R. H. S. F. 2003. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado*. São Paulo: Livraria Varela. 380p.

Viswanatan, S., Manikandan, S., Haniffa, A., Chairman, K., 2015. Evaluation of resistance against Antibiotics, Antiseptics and Disinfectants in *Aeromonas hydrophila* isolated from Marketed Fishes. *Pharmacology and Biology Evaluation*. 2(2): 40-46.

Yunxia, Q., Jianzhong, S., Guoliang, W. (2001). A review of principal bacterial diseases of mari-culture fish. *Transactions of Limnology and Oceanology*. 2: 78-87.

**SEGURANÇA AMBIENTAL DE POTENCIAIS DROGAS PARA USO NA
AQUICULTURA PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS E BIOMARCADORES
HISTOPATOLÓGICOS EM PACU, *Piaractus mesopotamicus***

Cynthia Venâncio Ikefuti^{1,2}; Claudinei da Cruz^{2,3}; Natália Sayuri Shiogiri⁴; Alfredo Kohiti Feres Yamauchi²; Taise Florêncio²; Maria José Tavares Ranzani-Paiva⁵

¹Centro de Aquicultura da Unesp – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 São Paulo, São Paulo, Brasil. Email: cynthia.ikefuti@gmail.com *autor correspondente

²Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 São Paulo, São Paulo, Brasil.

³Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia de Agrotóxicos – LEEA da Fundação Educacional de Barretos, Barretos, SP, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luiz, km 235, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil.

⁵Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos – CPDPO, Instituto de Pesca, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar a segurança ambiental de duas potenciais drogas no tratamento de doenças em peixes, o imidacloprid (IMD) e da associação de sulfadimetoxina + metronidazol (SM), com base nos dados (CE50 e CL50) para os organismos: *Lemna minor*, *Azolla caroliniana*, *Daphnia magna*, *Pomacea canaliculata*, *Bachydanio rerio*, *Hyphessobrycon eques*, *Oreochromis niloticus* e *Piaractus mesopotamicus* e avaliar o efeito histopatológico da exposição destas drogas em tecidos de pacu, *P. mesopotamicus*. Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados de acordo com normas nacionais e internacionais para cada espécie. Nos ensaios definitivos, todos os organismos foram expostos às concentrações de 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 mg L⁻¹ mais o controle. Não ocorreu mortalidade em todos os ensaios realizados. Assim, o valor

de CE e CL50 para todos os organismos foi $>100,0 \text{ mg L}^{-1}$ e as drogas foram classificadas como praticamente não tóxicas para as oito espécies. O IMD e a SM causaram hiperatividade e aumento do batimento opercular para todos os peixes testados no momento da administração, porém não causaram alterações nas variáveis físicas e químicas da água. O IMD causou aumento do epitélio interlamelar e ondulação da lamela secundária nas brânquias e hipertrofia e deslocamento do núcleo para a periferia dos hepatócitos. A SM causou aumento do epitélio interlamelar e estase das lamelas secundárias das brânquias e congestão dos capilares sinusóides hepáticos. Não ocorreram alterações nos rins dos peixes expostos às duas drogas. O IMD e a SM obtiveram classificação ecotoxicológica favorável para todos os organismos testados e causaram lesões reversíveis em brânquias e fígado de *P. mesopotamicus*.

Palavras-chave: Xenobióticos, Organismo Bioindicador, Toxicidade Aguda

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é baseada no sistema intensivo caracterizado pela alta densidade, alta taxa de arraçoamento e manejo intensivo. Esses fatores podem aumentar a possibilidade de ocorrência de doenças, causando perdas econômicas (Schalch et al. 2009; Dos Santos et al. 2014).

Uma das alternativas para o tratamento de doenças em peixes é a utilização de fármacos (Carraschi et al. 2014), como o inseticida Imidacloprid (IMD) e a associação de antimicrobianos Sulfadimetoxina com o Metronidazol (SM) são dois farmoquímicos com potencial uso na aquicultura no controle do monogenético *Anacanthorus penilabiatus* e da bactéria *Aeromonas hydrophila*, respectivamente.

O imidacloprid (1-[(6-chloro-3-pyridinylmethyl)-N-nitro-2-imidazolidinimine) pertence à classe química dos neonicotinóides que interagem com receptores nicotinérgicos do sistema nervoso central, causando paralisia no inseto. É um dos inseticidas mais vendidos e mais utilizados no mundo e utilizado tanto na área agrícola quanto na veterinária (Nauen e Bretschneider, 2002).

A associação da sulfonamida sulfadimetoxina [4-amino-N-(2,6-dimetoxi-4-pirimidinil)] com imidazól metronidazol [1: etil (2-hidroxi)-2-metil-5-nitroimidazol] é utilizada para o tratamento de giardíase em cães e gatos, seu uso é justificado pela ampliação do espectro de ação, pois, enquanto a sulfadimetoxina age contra protozoários e bactérias patogênicas, o metronidazol atua preferencialmente contra protozoários ciliados (CEPAV, 2015).

Para avaliar os efeitos causados pela exposição de fármacos em um ecossistema são utilizados ensaios de toxicidade aguda (Magalhães e Ferrão Filho, 2008) e recomenda-se empregar no mínimo três espécies de bioindicadores de diferentes níveis da cadeia trófica, afim de se, obter uma resposta de organismos sensíveis com diferentes metabolismos (Costa et al. 2008).

Em ambientes aquáticos, os xenobióticos ocorrem em concentrações subletais, de maneira que alterações na morfo-fisiologia dos organismos aquáticos são mais frequentes do que a mortalidade em massa (Albinati et al. 2007). Estas alterações podem ser utilizadas como biomarcadores e entre as possíveis metodologias, a histologia fornece uma medida mais direta dos efeitos tóxicos de poluentes ambientais (Au, 2004; Nogueira et al. 2011).

Assim, é essencial que o IMD e a SM sejam avaliados quanto à eficácia no tratamento de enfermidades e segurança ambiental para o peixe e para o ambiente aquático onde está inserido. Uma das formas de se avaliar essa segurança é pela classificação ecotoxicológica para os organismos alvo e não-alvo e também a análise dos efeitos histopatológicos para verificar as alterações causadas, caso reversíveis ou não no organismo aquático a ser estudado.

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a segurança ambiental do inseticida Imidacloprid e da associação de antibióticos Sulfadimetoxina + Metronidazol, com base nos dados (CE50 e CL50) para os organismos: macrófitas aquáticas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*; o microcrustáceo *Daphnia magna*; o molusco *Pomacea canaliculata* e os peixes *Bachydanio rerio*, *Hyphessobrycon eques*, *Oreochromis niloticus* e *Piaractus mesopotamicus* e avaliar o efeito histopatológico da exposição aguda destes fármacos em brânquias, fígado e rins de pacu, *P. mesopotamicus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, Nepeam e a rotina histopatológica foi realizada no Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia, ambos pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, campus de Jaboticabal.

O imidacloprid (200g L^{-1} de ingrediente ativo) na formulação Provado® foi adquirido em casas de implementos agrícolas e a associação de antimicrobiano Sulfadimetoxina + Metronidazol foi fornecido pela Cepav Pharma Ltda.

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, sob o número de protocolo 01116/14.

As drogas foram classificadas segundo a escala de toxicidade para organismos aquáticos de Zucker (1985).

2.1 Toxicidade aguda para *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*

As macrófitas foram aclimatadas em cristalizadores contendo meio de cultivo Hoagland's em sala de bioensaio com temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C e iluminação constante com 1000 lux, por três dias.

As plantas foram selecionadas, previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2% e água destilada e transferidas quatro colônias com três frondes cada de *L. minor* e cinco plantas de *A. caroliniana* para recipientes contendo o meio de cultivo Hoagland's (OECD, 2002).

Na avaliação da sensibilidade dos lotes das macrófitas foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância referência cloreto de sódio (NaCl, *Pro-analysis*) e a CL₅₀;7d para a *L. minor* foi de $0,73\text{ g L}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% entre $0,52\text{ g L}^{-1}$ e $1,04\text{ g L}^{-1}$ e para a *A. caroliniana* foi de $4,17\text{ g L}^{-1}$ com intervalo de confiança de 95% entre $3,59\text{ g L}^{-1}$ e $4,85\text{ g L}^{-1}$. Todas de acordo com a carta referência do laboratório.

A seguir, foram adicionadas as soluções de IMD e SM relativas às concentrações: 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 mg L⁻¹ mais o controle, com três réplicas. As avaliações da mortalidade das plantas foram realizadas em 3, 5 e 7 dias após a exposição, por meio da observação de necrose e clorose da *L. minor* (OECD, 2002) e da porcentagem de mortalidade de *A. caroliniana*, utilizando a escala de notas (E a A) segundo Silva et al. (2012).

2.2 Toxicidade aguda para *Daphnia magna*

Inicialmente, para avaliar a sensibilidade do lote dos organismos testes foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância referência cloreto de sódio (NaCl, *Pro-analisis*) e a concentração efetiva (CE50;48h) foi de 4,06 g L⁻¹ com intervalo de confiança de 95% entre 3,82 g L⁻¹ e 4,32 g L⁻¹, de acordo com a carta referência do laboratório.

A seguir, os neonatos selecionados com seis a 24 horas de vida foram expostos às concentrações de IMD de 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 mg L⁻¹ e de SM de 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 mg L⁻¹. Para tanto, em tubos de ensaio de vidro com volume 30,0 mL foram adicionados os volumes conhecidos de soluções estoques mais água natural ajustada, completando-se 9,0 mL. Cinco neonatos em 1,0 mL de água de cultivo foram adicionados, com volume final de 10,0 mL. Os ensaios foram realizados em sala de bioensaio, com temperatura de 20,0 ± 2,0 °C, em ambiente escuro, por 48 horas, com quatro réplicas e o controle. Os animais foram avaliados após 48 horas de exposição e os neonatos imóveis por 15 segundos foram considerados mortos (ABNT, 2009).

2.3 Toxicidade aguda para *Pomacea canaliculata*, *Brachydanio rerio*, *Hyphessobrycon eques*, *Oreochromis niloticus* e *Piaractus mesopotamicus*

Os caramujos com peso de 1,31 ± 0,20 g e os peixes: *B. rerio* com peso de 0,51 ± 0,03 g; *H. eques* com peso de 0,70 ± 0,19 g; *O. niloticus* com peso de 0,59 ± 0,06 g e *P. mesopotamicus* com peso de 1,73 ± 0,26 g foram aclimatados por dez dias em sala de bioensaio a 25 ± 2 °C, pH entre 7,0 e 8,0; oxigênio dissolvido > 4,0 mg L⁻¹ e condutividade elétrica entre 170,0 e 180,0 µS cm⁻¹ (ABNT, 2011).

Os peixes foram aclimatados separadamente em tanques com capacidade de 250 L com fluxo contínuo, aeração artificial e alimentados com ração comercial (28% de proteína), uma vez ao dia. Os caramujos foram aclimatados em tanques com capacidade de 60 L com aeração artificial e alimentados, uma vez ao dia, com a macrófita *Hydrilla verticillata*.

Na avaliação de sensibilidade dos animais foram realizados ensaios com a substância referência cloreto de potássio (KCl, *Pro-analysis*). A CE50;48h para o caramujo foi de 1,97 g L⁻¹ com intervalo de confiança de 95% entre 1,59 g L⁻¹ e 2,45 g L⁻¹; para *B. rerio* a CL50 foi de 1,30 g L⁻¹ (1,51 g L⁻¹ e 1,76 g L⁻¹); para *H. eques* a CL50 foi de 2,63 g L⁻¹ com intervalo entre (2,38 g L⁻¹ e 2,90 g L⁻¹); para *O. niloticus* a CL50 foi de 1,31 g L⁻¹ (0,99 g L⁻¹ e 1,75 g L⁻¹) e para *P. mesopotamicus* a CL50 foi de 1,54 g L⁻¹ (1,28 g L⁻¹ e 1,86 g L⁻¹). Todas de acordo com a carta referência do laboratório.

As concentrações de IMD e de SM utilizada nos ensaios definitivos foram: 70,0; 80,0; 90,0 e 100,0 mg L⁻¹ e o controle, para os cinco organismos. Os ensaios foram conduzidos em sistema estático, com cinco animais para *P. canaliculata* e *B. rerio* por réplica e três réplicas e três peixes por réplica para *H. eques*, *O. niloticus* e *P. mesopotamicus* também em triplicata.

A imobilidade dos caramujos, a mortalidade e os sinais de intoxicação dos peixes (agitação, posição na coluna d'água, batimento opercular, natação errática e capacidade de arfagem) e as variáveis físicas e químicas da água: pH, temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) e condutividade elétrica (μS cm⁻¹) (ABNT, 2011) foram mensuradas em sonda multiparâmetro (YSI Professional Plus®) em 0, 24 e 48 horas após a exposição.

2.4 Análises histopatológicas em *Piaractus mesopotamicus*

No final das 48h do ensaio agudo do IMD e SM, cinco peixes do controle e cinco da maior concentração (100,0 mg L⁻¹) foram eutanasiados em banho de imersão com benzocaína (1g 15 L⁻¹ de água) para a obtenção das amostras para as análises histopatológicas.

Os fragmentos de brânquias, fígado e rins foram fixados em formaldeído 10% tamponado (tampão PBS, 0,1M; pH 7,2) por 24 horas. Após a fixação, os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em resina. Em seguida foi realizada a microtomia em micrótomo automático (Leica, RM-2155) obtendo-se cortes 5 μ m de espessura e corados com azul de metileno (Behmer et al. 1976). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Labomed modelo LX400 em aumento de 100, 200 e 400X.

3. RESULTADOS

3.1 Ensaios de toxicidade aguda

Durante os ensaios de toxicidade não ocorreu mortalidade dos organismos para as duas drogas. Assim a CE/CL50 para *L. minor*; *A. caroliniana*; *D. magna*; *P. canaliculata*; *B. rerio*, *H. eques*, *O. niloticus* e *P. mesopotamicus* foi $> 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ e, assim, o IMD e a SM foram classificados como praticamente não tóxico (Zucker, 1985). Durante a administração das duas drogas ocorreu hiperatividade e aumento do batimento opercular em todas as concentrações e para *H. eques*, *O. niloticus* e *P. mesopotamicus*. As variáveis físicas e químicas da água não foram alterados com a presença dos dois fármacos (Tabela 1).

3.2 Análises histopatológicas em brânquias, fígado e rins de *Piaractus mesopotamicus*

A constituição das brânquias dos pacus do grupo controle é similar de peixes teleósteos (Carraschi et al. 2011), composta pela lamela primária, que é constituída por cartilagem que reveste e a sustenta, no seu interior ocorre a presença de um vaso sanguíneo a partir da lamela secundária. Esta é composta por células mucosas e células de sustentação. Entre as lamelas secundárias ocorre a formação do espaço interlamelar composto por células mucosas, células de revestimento e de cloreto (Figura 1A e C).

As brânquias dos peixes expostos à $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de IMD apresentaram aumento do epitélio interlamelar e ondulação da lamela secundária (Figura 1B). Em $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ de SM ocorreu aumento do epitélio interlamelar e aumento do

fluxo sanguíneo caracterizando estase das lamelas primárias e secundárias (Figura 1D).

Histologicamente, o fígado dos peixes no grupo controle apresentou organização cordonal dos hepatócitos formado a partir das veias centrais do órgão. Os hepatócitos apresentaram citoplasma claro (acidófilo) e núcleo (basófilo) levemente deslocado para a periferia da célula (Figura 1E). O fígado dos peixes expostos ao IMD apresentou hipertrofia e deslocamento do núcleo para a periferia dos hepatócitos (Figura 1F). Enquanto que a SM apresentou congestão dos capilares sinusóides (Figura 1G).

Os rins nos animais do grupo controle apresentam glomérulos e túbulos proximais e distais. No interstício de tecido composto por tecido conjuntivo frouxo, onde ocorre a presença do tecido hematopoiético (Figura 1H). Não foi observada alterações nos rins dos peixes expostos às duas drogas.

4. DISCUSSÃO

A OECD (2008) determina que os ensaios agudos devem ser realizado com a concentração limite de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, pois se não ocorrer mortalidade até esta concentração é possível verificar, com 99% de confiança que o organismo estudado não está no grupo mais sensível à substância testada.

Neste estudo foram utilizados oito organismos de três níveis tróficos e todos obtiveram a mesma classificação favorável para às duas drogas. O IMD e a SM obtiveram classificações semelhantes à outros inseticidas e antibióticos utilizados na aquicultura para o tratamento de doenças (Tabela 2).

O IMD atua como agonista dos receptores pós-sinápticos da acetilcolina (ACh) (Matsuda et al. 2001). No entanto, para Tišler et al. (2009) não ocorreu diferenças significativas na atividade da ACh em *D. magna* expostas ao IMD, o que demonstra que estas atividades enzimáticas não estão um biomarcador sensível de exposição ao inseticida, por isso a baixa toxicidade nos organismos testados no presente estudo.

S´anchez-Bayo e Goka, (2006) com base no levantamento de dados fotolíticos e de toxicidade, consideraram o imidacloprid como seguro para os organismos aquáticos e adequado para proteção integrada gestão (IPM). A baixa toxicidade para as macrófitas aquáticas também era esperada. Segundo SERA, (2005) plantas aquáticas são muito menos sensíveis ao imidacloprid do que peixes ou invertebrados aquáticos.

Os antimicrobianos do grupo das sulfonamidas são análogos estruturais do ácido paminobenzóico (PABA) e podem entrar na reação no lugar do PABA e competir pelo centro ativo da enzima diidropteroato-sintetase. Em consequência, formam-se análogos não funcionais do ácido fólico, impedindo o crescimento da célula bacteriana (Kim et al. 2007). As células animais são incapazes de sintetizar o ácido fólico e dependem de fontes exógenas (Korolkovas, 1996), não sendo afetadas pela sulfadimetoxina, o que justifica sua baixa toxicidade para os organismos testados.

A hiperatividade durante os ensaios com o IMD e a SM está relacionada à resposta de escape e costuma ser utilizada por peixes em tentativas de capturas de presas, fuga de um predador ou em qualquer situação de alteração do meio onde ele se encontra (Reidy et al. 2000; Silva et al. 2010), como no momento da administração das duas drogas.

Em peixes, as brânquias, rins e intestino desempenham um papel importante no metabolismo e excreção de xenobióticos, embora o fígado seja conhecido por ser o principal órgão onde ocorrem esses processos (Van der Oost et al. 2003). Neste estudo, as alterações nas brânquias, fígado e rins de *P. mesopotamicus* se enquadram nas lesões de primeira e segunda de fase proposta por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e adaptada por Meletti et al. 2003. Nestas fases, as alterações são reversíveis uma vez as condições ambientais são melhoradas (Sensini et al. 2008).

A maior parte das lesões causadas por exposições subletais em brânquias afeta epitélio lamelar (Hinton e Lauren, 1990). O aumento do epitélio interlamelar é um mecanismo de defesa onde brânquias tentam aumentar a distância entre o ambiente externo e o sangue, servindo assim como uma

barreira para a entrada de contaminantes (Erkmen e Kolankaya, 2000). Essa alteração também foi observada em *Poecilia reticulata* exposta ao herbicida glyphosate (Rocha et al. 2015); em *Cichlasoma dimerus* exposto ao endosulfan (Da Cuna et al. 2011) e em pacus infectados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com florfenicol (Carraschi et al. 2011).

A ondulação das lamelas secundárias é resultado da exposição das brânquias ao TFB. Para Wood (1960), os pesticidas causam perda da adesão entre a célula epitelial e o sistema subjacente de células pilares acompanhado por um colapso na integridade estrutural das lamelas secundárias. Essa alteração também ocorreu em *Rutilus rutilus* exposto ao diazinon (Katuli et al. 2014); em *Glossogobius giuris* expostos ao óleo de neem (Mamatha e Mohan, 2013) e em *R. rutilus* tratados com permanganato de potássio e formoldeído (Ghelichpour et al. 2014).

A estase é uma obstrução das lamelas secundárias causadas pelo excesso de células sanguíneas (Mallatt, 1985) e também uma das alterações causadas pela presença de xenobióticos na água. Essa alteração também foi observada em *Prochilodus lineatus* submetidos a testes *in situ* por sete dias em um ribeirão urbano contaminado (Camargo e Martinez, 2007); em *Trachinotus carolinus* expostos a concentrações subletais de naftaleno (Santos et al. 2011) e em *P. mesopotamicus* expostos à atrazina (Santos et al. 2015).

A hipertrofia e o deslocamento do núcleo dos hepatócitos são decorrentes do aumento no número de organelas responsáveis por metabolizar a droga (Simonato et al. 2007) como descrito por Carraschi et al. (2011) em pacus infectados com *A. hydrophila* e tratados com florfenicol; por Van Dik et al. (2012) em *Clarias gariepinus* em diferentes ecossistemas aquáticos da África do Sul e por Shiogiri et al. (2012) em pacus expostos ao glyphosate.

A congestão dos capilares sinusóides é consequência do aumento do fluxo sanguíneo para o processo de detoxificação do fígado. A incapacidade de sangue para chegar à veia central faz com que o fígado bombeie o sangue mais forte, resultando em estresse do órgão (Olojo et al. 2005). Essas alterações também ocorreram em *Clarias gariepinus* expostos ao chumbo (Olojo et al. 2005); em *C.*

gariepinus expostos ao glyphosate (Olurin et al. 2006) e em *Leporinus macrocephalus* também expostos ao glyphosate (Albiati et al. 2009).

5. CONCLUSÃO

O inseticida imidacloprid e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina + metronidazol possuem potencial para utilização na aquicultura, pois obtiveram classificação ecotoxicológica favorável para todos os oito organismos dos três níveis tróficos testados e causaram lesões reversíveis em brânquias e fígado de *P. mesopotamicus*.

No entanto, estudos são necessários para verificação da eficácia destes fármacos no controle de patógenos em peixes, bem como o período de carência destes na água, no solo dos tanques e no músculo dos peixes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2009. NBR 15088: ecotoxicologia aquática. Toxicidade aguda – método de ensaio em microcrustáceos. 19p.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011. NBR 15088: ecotoxicologia aquática. Toxicidade aguda – método de ensaio em peixes. 19p.

Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V. D., Santos, G. B., Lira, A. D. D., 2007. Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piauçu ("*Leporinus macrocephalus*"). Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 8(3): 184-192.

Albinati, A. C. L., Moreira, E. L. T., Albinati, R. C. B., Carvalho, J. V., De Lira, A. D., Santos, G. B., Vidal, L. V. O., 2009. Histological biomarkers: chronic toxicity for roundup in piauçu (*Leporinus macrocephalus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 61(3): 621-627.

Au, D. W. T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Marine Pollution Bulletin. 48(9): 817-834.

Behmer, A. O., Tolosa, E. M. C., Feritas-Neto, A. G., 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 239p.

Camargo, M. M., Martinez, C. B., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*. 5(3): 327-336.

Carraschi, S. P., da Cruz, C., Neto, J. G. M., Ignacio, N. F., Barbuio, R., Machado, M. R. F., 2012. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 83: 115-120.

Carraschi, S. P., Barbuio, R., Ikefuti, C. V., Florêncio, T., da Cruz, C., Ranzani-Paiva, M. J. T., 2014. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*. 431: 124-128.

Carraschi, S. P., Da Cruz, C., Florencio, T., Da Silva, A. F., Marques, A. M., Garlich, N., Paiva, M. J. T. R., 2015. Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 7(3): 31-36.

CEPAV. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ). Giardacid, 2015. Disponível em <http://www.biocom.com.br/giardacid.htm>

Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M., Espindola, E. L., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*,31(7): 1820-1830.

Da Cuna, R. H., Vazquez, G. R., Piol, M. N., Guerrero, N. V., Maggese, M. C., Nostro, F. L. L., 2011. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(4): 1065-1073.

Dos Santos, F. G. B., Gouveia, G. V., De França, C. A., De Souza, M. G., Da Costa, M. M., 2014. Microbiota bacteriana com potencial patogênico em pacamã e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. *Revista Caatinga*, 27(2): 176-183.

Erkmen, B., Kolankaya, D., 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River. *Turkey Bulletin Environmental Contamination Toxicology*. 64: 418–425.

Florêncio, T., Carraschi, S. P., Da Cruz, C., 2014. Bioindicadores neotropicais de ecotoxicidade e risco ambiental de fármacos de interesse para aquicultura. Boletim do Instituto de Pesca. 40(4): 569-576.

Fossen, M., 2006. Environmental Fate of Imidacloprid, California Department of Pesticide Regulation. 16p.

Ghelichpour, M., Rajabiesterabadi, H., Hoseini, S. M., 2014. Gill histopathological characteristics of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings treated with potassium permanganate and formalin. Aquaculture Research. 47(1): 276-282.

Hinton, D. E., Lauren, D. J., 1990). Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In American Fisheries Society Symposium. 8: 51-66.

Katuli, K., Amiri, B. M., Yelghi, S., 2014. Sublethal effects of organophosphate, diazinon on gill tissue and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fingerling kept in fresh water and brackish water. Iranian Journal of Aquatic Animal Health. 1(1): 37-44.

Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. G., Park, J., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. Environment International. 33(3): 370-375.

Korolkovas, A., 1989. Planejamento de Fármacos. Ciência e Cultura. 41(6): 528 - 537.

Lanzky, P. F., Halting-Sørensen, B., 1997. The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. Chemosphere. 35(11):2553-2561.

Lau, A. H., Lam, N. P., Piscitelli, S. C., Wilkes, L., Danziger, L. H., 1992. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. Clinical Pharmacokinetics. 23(5): 328-364.

Magalhães, D. P., Ferrão Filho, A. S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Oecologia Brasiliensis. 12(3): 355-381.

Mallatt, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Canadian Journal Fisheries Aquatic Science. 42: 630-648.

Mamatha, P., Mohan, M. R., 2013. Impact of nualgi on histopathological alteration in the gills of fish, *Glossogobius giuris* (ham) brought by neem oil. Pollution Research. 32(3): 457-465.

Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., Sattelle, D. B., 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. Trends in Pharmacology Science. 22(11): 573-580.

Meletti, P. C., Rocha, O., Martinez, C. D. R., 2003. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos: Rima Editora, p.149-180.

Nauen, R., Bretschneider, T., 2002. New modes of action of insecticides. Pesticides. Outlook. 12: 241-245.

Nogueira, D. J., de Castro, S. C., Vieira, R. C. A., de Sá, O. R., de Azevedo Santos, V. M., 2011. Utilização das brânquias de *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) (Siluriformes; Pimelodidae) como biomarcador de poluição no reservatório da UHE Marechal Mascarenhas de Moraes, Minas Gerais, Brasil. Biotemas, 24(3): 51-58.

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

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

Olojo, E. A. A., Olurin, K. B., Mbaka, G., Oluwemimo, A. D., 2005. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. African Journal of Biotechnology. 4(1): 117-122.

Olurin, K. B., Olojo, E. A. A., Mbaka, G. O., Akindele, A. T., 2006. Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to herbicide, glyphosate. African Journal of Biotechnology. 5(24): 2480-2487.

Park, S., Choi, K., 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. Ecotoxicology. 17(6): 526-538.

Pfeuffer, R.J., Matson, F., 2001. Pesticide Surface Water Quality Report: March 2001 Sampling Event. South Florida Water Management District, USA.

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundžic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R.; Lloyd, R. Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing News Books. Oxford.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Ishikawa, C. M., Campos, B. E. S., Eiras, A. C., 1997. Hematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus*, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia. 4(2): 329-339.

Rocha, T. L., dos Santos, A. P. R., Yamada, Á. T., de Almeida Soares, C. M., Borges, C. L., Bailão, A. M., Sabóia-Moraes, S. M. T., 2015. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. Environmental Toxicology and Pharmacology. 40(1): 175-186.

Reidy, S. P., Kerr, S. R., Nelson, J. A., 2000. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. Journal of Experimental Biology. 203: 347–357.

Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2006. Ecological effects of the insecticide imidacloprid and a pollutant from antidandruff shampoo in experimental rice fields. Environmental Toxicology Chemistry. 25(6): 1677-1687.

Santos, T. C., Gomes, V., Passos, J., Rocha, A., Salaroli, R., Ngan, P., 2011. Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene. Pan-American Journal of Aquatic Science. 6(2): 109-120.

Santos, E. A. D., Cruz, C. D., Carraschi, S. P., Marques Silva, J. R., Grossi Botelho, R., Velini, E. D., Pitelli, R. A., 2015. Atrazine levels in the Jaboticabal water stream (São Paulo State, Brazil) and its toxicological effects on the pacu fish *Piaractus mesopotamicus*. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. 66(1): 73-82.

Schalch, S. H. C., Moraes, F. R. D., Soares, V. E., 2009. Praziquantel, levamisole and diflubenzuron in the control of *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) and *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) in *Piaractus*

mesopotamicus Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 18(1): 53-59.

Sensini, C., Della Torre, C., Corsi, I., Focardi, S., 2008. First observations of histopathological effects of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) in gills of European eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). Cell Biology and Toxicology. 24(6): 621-628.

SERA, 2005. Imidacloprid – Human Health and Ecological Risk Assessment – Final Report; Prepared for USDA, Forest Service, USA (SERA TR 05-43-24-03a).

Shiogiri, N. S., Paulino, M. G., Carraschi, S. P., Baraldi, F. G., da Cruz, C., Fernandes, M. N., 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 34(2): 388-396.

Silva, B. M., Ravaneli, M. A. C., Paschoalato, C. F. P. R., 2010. Toxicidade aguda dos herbicidas diuron e hexazinona à *Danio rerio*. Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente. 20: 17-28.

Silva, A. F., Cruz, C., Neto, A. N., Pitelli, R. A., 2012. Ecotoxicidade de herbicidas para a macrófita aquática (*Azolla caroliniana*). Planta Daninha. 30(3): 541-546.

Simonato, J. D., Guedes, C. L. B., Martinez, C. B. R., 2007. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicology and Environmental Safety. 69(1): 112-120.

Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., Trebše, P., 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. Chemosphere. 76(7): 907-914.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 13: 57–149.

Van Dyk, J. C., Cochrane, M. J., Wagenaar, G. M., 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. Chemosphere. 87(4): 301-311.

Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K. O., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. Chemosphere. 40(7): 723-730.

Wood, E. M., 1960. Definitive diagnosis of fish mortalities. Journal (Water Pollution Control Federation). 994-999.

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

7. TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas dos ensaios de toxicidade aguda do IMD e do SM para *P. canaliculata*, *B. rerio*, *H. eques*, *O. niloticus* e *P. mesopotamicus*.

IMIDACLOPRID				
Organismo	Temp. (°C)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mg L^{-1})	pH
<i>P. canaliculata</i>	25,92 $\pm$ 0,06	195,4 $\pm$ 1,59	4,28 $\pm$ 0,04	8,1 $\pm$ 0,16
<i>B. rerio</i>	24,85 $\pm$ 0,04	187,4 $\pm$ 0,12	4,42 $\pm$ 0,08	8,4 $\pm$ 0,24
<i>H. eques</i>	23,80 $\pm$ 0,14	183,2 $\pm$ 0,55	2,98 $\pm$ 0,01	8,3 $\pm$ 0,04
<i>O. niloticus</i>	23,40 $\pm$ 0,40	198,2 $\pm$ 5,49	5,48 $\pm$ 0,47	8,4 $\pm$ 0,06
<i>P. mesopotamicus</i>	24,13 $\pm$ 0,29	189,2 $\pm$ 6,30	2,85 $\pm$ 0,19	8,0 $\pm$ 1,13
SULFADIMETOXINA + METRONIDAZOL				
Organismo	Temp. (°C)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mg L^{-1})	pH
<i>P. canaliculata</i>	25,48 $\pm$ 0,33	198,9 $\pm$ 6,52	3,20 $\pm$ 0,08	8,0 $\pm$ 0,30
<i>B. rerio</i>	24,85 $\pm$ 0,18	191,7 $\pm$ 1,00	4,65 $\pm$ 0,12	8,4 $\pm$ 0,43
<i>H. eques</i>	23,83 $\pm$ 0,23	188,1 $\pm$ 2,68	3,30 $\pm$ 0,77	8,3 $\pm$ 0,09
<i>O. niloticus</i>	23,27 $\pm$ 0,32	189,2 $\pm$ 5,89	5,55 $\pm$ 0,54	8,4 $\pm$ 0,06
<i>P. mesopotamicus</i>	24,12 $\pm$ 0,28	193,6 $\pm$ 3,20	3,28 $\pm$ 0,19	8,0 $\pm$ 0,97

Temp = temperatura; CE = condutividade elétrica; OD = oxigênio dissolvido

Tabela 2. Valores de CE e CL50 de antibióticos e ectoparasiticidas para organismos não alvos.

Droga	Espécie	Duração	Valor (mg L⁻¹)	Referência
Sulfadimetoxina	<i>D. magna</i>	CE50;48h	248,0	Kim et al. 2007
Sulfadimetoxina	<i>O. latipes</i>	CL50;48h	>100,0	Kim et al. 2007
Sulfadimetoxazol	<i>D. magna</i>	CE50;48h	123,1	Park e Choi, 2008
Sulfatiazol	<i>D. magna</i>	CE50;48h	149,3	Kim et al. 2007
Sulfatiazol	<i>O. latipes</i>	CE50;48h	>500,0	Kim et al. 2007
Metronidazol	<i>D. magna</i>	CL50;24h	>1000,0	Wollenberger et al. 2000
Metronidazol	<i>B. rerio</i>	CL50;96h	>500,0	Lanzki et al. 1997
Florfenicol	<i>P. canaliculata</i>	CE50;48h	>100,0	Florencio et al. 2014
Florfenicol	<i>L. minor</i>	CE50;7d	97,03	Carraschi et al. 2015
Florfenicol	<i>H. eques</i>	CL50;48h	>100,0	Florencio et al. 2014
Florfenicol	<i>P. mesopotamicus</i>	CL50;48h	>100,0	Florencio et al. 2014
Imidacloprid	<i>B. rerio</i>	CL50;96h	241,0	Tišler et al. 2009
Imidacloprid	<i>L. idus melanotus</i>	CL50;96h	237,0	Pfeuffer e Matson, 2001
Imidacloprid	<i>O. mykiss</i>	CL50;24h	211,0	SERA, 2005
Imidacloprid	<i>Cyprinus carpio</i>	CL50;24h	280,0	Fossen, 2006
Thiamethoxan	<i>P. mesopotamicus</i>	CL50;48h	16,97	Carraschi et al. 2015
Thiamethoxan	<i>L. minor</i>	CL50;7d	>100,0	Carraschi et al. 2015
Thiamethoxan	<i>H. eques</i>	CL50;48h	49,8	Carraschi et al. 2015

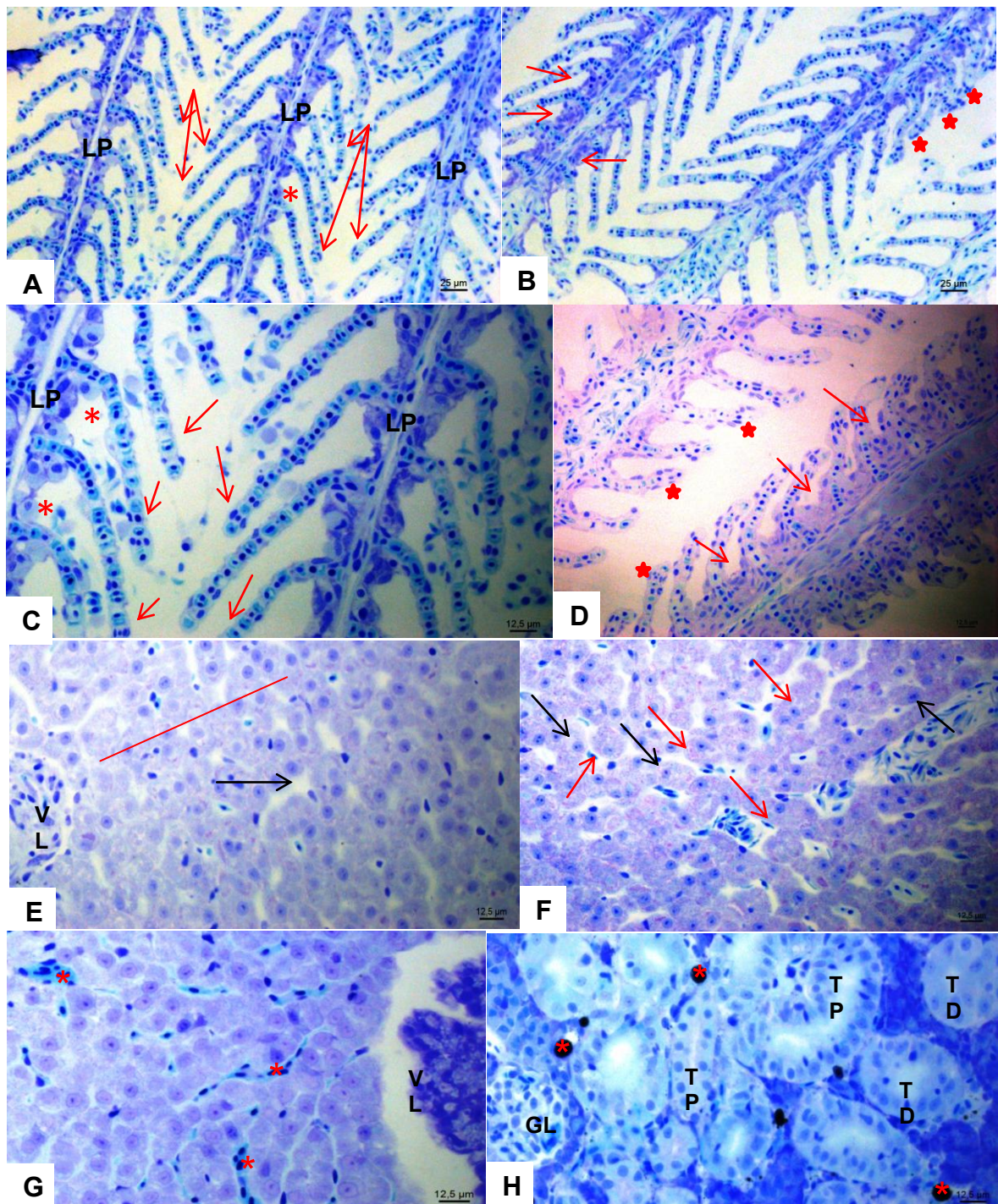


Figura 1. Fotomicrografia de brânquias (A, B, C, D) fígado (E, F, G) e rins (H) de pacu. **A.** LP: Lamela primária, Setas: Lamelas secundárias. **B.** IMD 100 mg L⁻¹. Seta: aumento do epitélio interlamelar. Estrela: ondulação das lamelas secundárias. **C.** LP: Lamela primária, Setas: Lamelas secundárias. **D.** SM 100 mg L⁻¹. Seta: aumento do epitélio interlamelar. Estrela: estase das lamelas secundárias. **E.** Controle. VL: Veia Lobular; Seta: Capilar Sinusóide; Linha: Arranjo cordonal dos hepatócitos. **F.** IMD 100 mg L⁻¹. Seta vermelha: hipertrofia. Seta preta: núcleo deslocado para a periferia. **G.** SM 100 mg L⁻¹. Asterisco: congestão dos capilares sinusóides. **H.** TD: Túbulo Distal; TP: Túbulo Proximal; GL: Glomérulo. Asterisco: Cento de melanomacrófado. Fotomicrografias A e B. Aumento de 20X, barra de 25,0 µm. Fotomicrografia restantes. Aumento de 40X, barra de 12,5 µm. Coloração Azul de metileno.

**EFICÁCIA DE CONTROLE DE *Anacanthorus penilabiatus* COM
IMIDACLOPRID E RESPOSTAS HEMATOIMUNOLÓGICAS DE *Piaractus
mesopotamicus* DURANTE O TRATAMENTO E RECUPERAÇÃO**

Cynthia Venâncio Ikefuti^{1,2}; Alfredo Kohiti Feres Yamauchi²; Thais Heloisa Vaz
Farias¹; Claudinei da Cruz^{2,3}; Maria José Tavares Ranzani-Paiva⁴

¹ Centro de Aquicultura da Unesp – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 São Paulo, São Paulo, Brasil. Email: cynthia.ikefuti@gmail.com *autor correspondente

² Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia de Agrotóxicos – LEEA da Fundação Educacional de Barretos, Barretos, SP, Brasil.

⁴ Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos – CPDPO, Instituto de Pesca, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO – Os objetivos deste estudo foram verificar a eficácia (5 dias) e a recuperação (14 dias) em *Piaractus mesopotamicus* infestados experimentalmente com o monogenético *Anacanthorus penilabiatus* e tratados com inseticida imidacloprid (IMD) pelo monitoramento das alterações hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas, imunológicas e das variáveis físicas e químicas da água. O experimento foi conduzido por 19 dias, com quatro tratamentos: controle sadio; peixes sadios expostos a 88,0 mg L⁻¹ de IMD; peixes infestados com monogenéticos e não tratados e um tratamento composto por peixes infestados com *A. penilabiatus* e tratados com 88,0 mg L⁻¹ de imidacloprid, com tempo de uma hora de exposição por dia por cinco dias. No final do tratamento foi observada redução significativa de 81,32% no número de parasitos, e aumento do número de eritrócitos nos peixes tratados. Após 14 dias do final do tratamento, foi observada redução dos valores de hemoglobina e CHCM dos peixes expostos ao

IMD. Apesar da redução significativa no número de parasitos, estudos visando período de recuperação maior devem ser realizados para verificar a reversibilidade do quadro anêmico dos peixes.

Palavras-chave: Monogenético, Doenças de Peixes, Aquicultura.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os monogenéticos representam um dos grupos mais importantes na aquicultura (Martins et al. 2002) e encontrados em brânquias, narinas e superfície do corpo dos hospedeiros (Jerônimo et al. 2014). Estes parasitos apresentam um alto grau de especificidade pelo hospedeiro, aproximadamente 84,1% destes são encontrados em uma única espécie, gênero ou família de peixe (Shulman, 1961), como por exemplo, o monogenético *Anacanthorus penilabiatus* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Franceschini et al. 2013).

Para o tratamento de infestações de monogenéticos são utilizados vários parasiticidas anti-helmínticos, como a formalina (Sharp et al. 2004), o metil parathion e azadiracthina (Cruz et al. 2008), o diflubenzuron (Schalch et al. 2009), o febendazol (Forwood et al. 2013), o triclorfon (Zhang et al. 2014), o praziquantel (Sharp et al. 2004; Forwood et al. 2013; Zhang et al. 2014), o mebendazol (Katharios et al. 2006; Zhang et al. 2014) e o peróxido de hidrogênio (Benavides-González et al. 2015).

Um inseticida que possui potencial na aquicultura para ser utilizado no controle de *A. penilabiatus* é o Imidacloprid (1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine). Ele pertence à classe química dos neonicotinóides que interagem com receptores nicotinérgicos do sistema nervoso central, causando paralisia no inseto (Nauen e Bretschneider, 2002).

Para o uso de um fármaco na aquicultura brasileira é necessário o desenvolvimento de protocolos de tratamento seguros e específicos para peixes neotropicais como o pacu, uma das espécies mais estudadas e criadas no Brasil e importante para aquicultura e pesca esportiva (Jomori et al. 2005; Abimorad et al. 2014).

Assim, os objetivos deste estudo foram verificar a eficácia e a recuperação de *P. mesotamicus* infestados experimentalmente com o monogenético *A. penilabiatus* e tratados com inseticida imidacloprid pelo monitoramento das variáveis físicas e químicas da água e das alterações hematológicas, bioquímicas, imunológicas e osmo-iônicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

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

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, sob o número de protocolo 01116/14.

O imidacloprid (200g L⁻¹ de ingrediente ativo) na formulação Provado[®] foi adquirido de forma comercial. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste F para verificar a homogeneidade dos dados e o teste de Tukey para verificar as diferenças entre os tratamentos, com resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

2.1. Infestação experimental, eficácia e recuperação de *Piaractus mesopotamicus* infestados com *Anacanthorus penilabiatus*

Para a infestação experimental, 200 pacus, com peso médio de 60 ± 15 g foram mantidos em um tanque com capacidade para 400 L nas seguintes condições: baixa concentração de oxigênio dissolvido ($< 4,0$ mg L⁻¹), excesso de matéria orgânica, alimentação a cada 48 horas e com captura periódica. Após esse processo, uma amostragem (n=3) foi submetida à coleta das brânquias para contagem inicial de parasitos. Nesta contagem, os pacus apresentaram no mínimo 200 monogenéticos peixe⁻¹ (Cruz et al. 2008).

Dois experimentos preliminares (30,0 e 50,0 mg IMD L⁻¹ no primeiro experimento e 60,0 e 80,0 mg IMD L⁻¹ no segundo) foram realizados em laboratório para definir a concentração ideal para o experimento de eficácia em

mesocosmos. Para cada experimento foram utilizados 30 pacus com peso médio de $60,0 \pm 15$ g distribuídos em seis caixas ($n = 5$) com capacidade de 60 L, com fluxo de água constante em 10 mL s^{-1} .

O tratamento foi realizado por cinco dias na forma de banho terapêutico, com uma hora de exposição por dia, em delineamento inteiramente casualizado. Após a administração do IMD e o fluxo das caixas permaneceu fechado por uma hora. No sexto dia, seis pacus de cada tratamento foram eutanasiados e coletadas as brânquias para contagem final de parasitos (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios $\pm$ desvio padrão do número de parasitos amostrados, eficácia e sobrevivência nos experimentos preliminares de eficácia do imidacloprid em pacu, *P. mesopotamicus*.

Tratamento (mg L^{-1})	Número de parasitos	Eficácia (%)	Sobrevivência (%)
Inicial	$233,78 \pm 166,81$	-	-
Controle	$120,66 \pm 32,52$	-	100
30,0	$58,33 \pm 36,23$	33,0	100
50,0	$34,33 \pm 2,51$	61,0	100
Controle	$299,40 \pm 198,20$	-	100
60,0	$85,0 \pm 30,73$	75,3	100
80,0	$50,0 \pm 10,27$	86,1	100

A concentração escolhida para o experimento de eficácia foi a de $88,0 \text{ mg L}^{-1}$, referente concentração mais eficaz nos experimentos preliminares acrescidos de 10% deste valor ($80,0 + 8,0 \text{ mg L}^{-1}$) para ajustar à variação ambiental e alteração de condição de experimento. Para o experimento de eficácia em mesocosmos, 300 pacus com peso de $138,5 \pm 20$ g ($n=25$) foram distribuídos em 12 tanques com capacidade de 400L com fluxo de água constante em 10 mL s^{-1} .

O experimento foi conduzido por 19 dias (cinco de eficácia e 14 dias de recuperação), conduzido com delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, em triplicata. Os tratamentos foram dispostos em: controle sadio (SAD); peixes sadios expostos a $88,0 \text{ mg L}^{-1}$ de imidacloprid na forma de banho terapêutico (EXP); infestados com *A. penilabiatu*s e não tratados (NTRAT); e infestados com *A. penilabiatu*s e tratados com $88,0 \text{ mg L}^{-1}$ de imidacloprid na forma de banho terapêutico (TRAT).

Durante 60 dias, os tratamentos NTRAT e TRAT foram mantidos nas seguintes condições: baixa concentração de oxigênio dissolvido ($< 4,0 \text{ mg L}^{-1}$), excesso de matéria orgânica, alimentação a cada 48 horas e com captura periódica. Após esse processo, semanalmente, foram amostrados as brânquias de dois peixes para contagem inicial de parasitos. Neste procedimento, os pacus apresentaram em média $82,67 \pm 25,41$ de monogenéticos peixe⁻¹.

As variáveis físicas e químicas da água: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) foram mensurada antes e imediatamente após da primeira aplicação e 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 19 dias com o auxílio de um aparelho de multiparâmetros YSI Professional Plus[®].

No sexto dia, nove pacus dos tratamentos NTRAT e TRAT e cinco peixes dos tratamentos EXP e SAD foram eutanasiados e submetidos à coleta das brânquias para contagem final de parasitos. A determinação da eficácia no tratamento dos parasitos presentes na superfície corporal foi calculada de acordo com fórmula: $E = 100 - [(D \times 100) / A]$, onde: E é a eficácia (%), A é a média de ectoparasitos antes do tratamento, e D é a média ectoparasitos após o tratamento.

2.2. Variáveis hematológicas, bioquímicas e osmo-iônicas

Em 24 horas após o termino da avaliação da eficácia e no final da recuperação (dia 19) foi coletada amostra de sangue de nove peixes de cada tratamento. As alíquotas de sangue foram retiradas via punção do vaso caudal com seringa heparinizada para determinação das variáveis hematoimunológicas.

As variáveis hematológicas: o número de eritrócitos (RBC) (n mm^{-3}) foi estimado com solução salina 0,7% e câmara de Neubauer; o hematócrito (Hct) (%) foi determinado pelo método de microhematócrito e a hemoglobina (Hb) (g 100 mL^{-1}) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina e leitura em espectrofotômetro em 540 nm. Os valores de RBC, Hct e Hb foram utilizados para o cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM, fL) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, g dL^{-1}). A análise bioquímica de proteínas totais foi realizada por refratômetro.

A contagem total e diferencial de leucócitos (monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, leucócitos imaturos) e trombócitos foram efetuadas em extensões sanguíneas coradas com MGGW (May Grünwald-Giemsa-Wright) (Rosenfeld, 1947) e o número absoluto de leucócitos e de trombócitos foi estimado pelo método indireto (Hrubec e Smith, 1998).

O plasma sanguíneo foi armazenado em freezer -20 °C para as análises de osmolalidade e íons plasmáticos (Na^+ , K^+ e Cl^-). A osmolaridade plasmática foi determinada utilizando um semi-microsmômetro ($\mu\text{OSMETTE}$ precision system) que tem como base o ponto de congelamento e foi expressa em mOsmol kg^{-1} . As concentrações de íons Na^+ e K^+ foram determinadas com o auxílio de um fotômetro de chama (DIGMED DM-61), na proporção 1:100 de plasma e água destilada. A concentração de íons Cl^- foi determinada utilizando um kit comercial (LABTEST) com absorvância de 490 nm, em uma leitora de microplaca (MRX-HD-DYNEX). As concentrações de íons foram expressas em mEq L^{-1} .

2.3. Resposta imune inata

A atividade respiratória dos leucócitos (*burst* respiratório) foi determinada segundo protocolo de Anderson e Siwichi, (1994) modificado por Biller-Takahashi et al. (2013). O método determina as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo *burst* respiratório através do ensaio colorimétrico baseado na redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT) que formam grânulos de formazan e apresentam coloração escuro no interior dos fagócitos (Klein, 1990).

3. RESULTADOS

3.1. Eficácia do imidacloprid no controle de *Anacanthorus penilabiatus*

Após cinco dias de tratamento ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) no número de *A. penilabiatus*. Os peixes infestados e não tratados apresentaram em média $128,50 \pm 79,20$ parasito/peixe, enquanto que, os infestados e tratados com $88,0 \text{ mg L}^{-1}$ de IMD reduziu para $24,00 \pm 13,58$ parasito/peixe, o que representa eficácia de 81,32% (Tabela 2). O número de monogenéticos encontrados no

grupo de peixes no tratamento SAD e EXP foram $34,50 \pm 19,15$ e $39,50 \pm 14,77$, respectivamente (Tabela 2).

Durante o período experimental não ocorreu mortalidade e as variáveis físicas e químicas da água não foram alteradas. A temperatura média foi de $29,47 \pm 1,50$ °C; a condutividade elétrica da água de $197,1 \pm 11,95$ $\mu\text{S cm}^{-1}$; o oxigênio dissolvido na água de $4,36 \pm 1,50$ mg L^{-1} e o pH de $8,6 \pm 0,17$.

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio padrão do número de parasitos amostrados, eficácia e sobrevivência no experimento definitivo de eficácia do imidacloprid em pacu, *P. mesopotamicus*.

Tratamento	Número de parasitos	Eficácia (%)	Sobrevivência (%)
NTRAT	$128,50 \pm 79,20$ b	-	100
TRAT	$24,00 \pm 13,58$ a	81,32	100
EXP	$39,50 \pm 14,77$ a	69,26	100
SAD	$34,50 \pm 19,15$ a	73,15	100

NTRAT = Infestado não tratado; TRAT = Infestado tratado com $88,0$ mg L^{-1} de imidacloprid na forma de banho terapêutico; SAD = Sadio; EXP = Exposto a $88,0$ mg L^{-1} de imidacloprid na forma de banho terapêutico. Valores seguidos por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.2. Variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata após o experimento de eficácia

Após cinco dias de tratamento com IMD, a única alteração significativa observada foi aumento do número de eritrócitos nos peixes do tratamento TRAT (Tabela 3). Não ocorreu variação significativa nos parâmetros bioquímicos, osmo-iônicos e imunológicos no final do experimento de eficácia (Tabela 4).

Tabela 3. Valores das variáveis sanguíneas da série vermelha e branca de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de eficácia do imidacloprid.

Parâmetro/Células	NTRAT	TRAT	EXP	SAD
Hematócrito (%)	30,16667 b	32,83333 ab	34,44444 a	33,05556 ab
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	5,858257	6,129139	6,446311	6,352017
VCM (fL)	201,4347 b	232,3714 b	220,2687 ab	195,3084 ab
CHCM (g dL ⁻¹)	19,57174	18,97631	18,73486	19,36088
Eritrócitos (10 ³ µ L ⁻¹)	1522222 ab	1724444 a	1605556 ab	1426667 b
Trombócitos	11676,05	13107,90	13561,56	14099,74
Leucócitos	23544,32	26272,65	25215,46	22742,23
Linfócitos	17464,05	16132,03	20607,80	18268,81
Monócitos	1334,857	1771,898	1328,755	1266,164
Neutrófilos	509,168	1285,811	1129,663	677,500
Eosinófilos	365,4239	280,2434	184,3838	158,7435
CGE	242,0255	426,8810	201,2643	271,2685
Linfócito imaturo	3628,796 a	3390,038 a	1763,597 b	2099,741 ab

Células Granulocíticas Especiais (CGE). Valores seguidos por letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 4. Valores das variáveis séricas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de eficácia do imidacloprid.

Parâmetro	NTRAT	TRAT	EXP	SAD
Burst	0,446000	0,526444	0,526111	0,497889
Proteína	3,061111	3,161111	3,322222	3,150000
Osmolaridade	279,0000	306,5556	287,0000	277,1111
Sódio (Na ⁺)	240,0000	237,2222	248,1111	237,7778
Potássio (K ⁺)	1,933333 a	1,244444 b	1,311111 ab	1,500000 ab
Cloreto (Cl ⁻)	309,7556	316,1481	279,1037	210,1259

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

3.3. Variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata após o experimento de recuperação

Durante a recuperação não ocorreu mortalidade dos peixes e as variáveis físicas e químicas da água não foram alteradas. A temperatura média foi de 29,45 ± 1,49 °C; a condutividade elétrica da água de 195,6 ± 10,35 µS cm⁻¹; o oxigênio dissolvido na água de 4,19 ± 1,64 mg L⁻¹ e o pH de 8,6 ± 0,24.

Após 14 dias do final do tratamento (recuperação) ocorreu redução dos valores de hemoglobina e CHCM dos peixes do tratamento EXP (Tabela 5). Não ocorreu variação significativa nas variáveis bioquímicas, osmo-iônicas e imunológicas no final do experimento de eficácia (Tabela 6).

Tabela 5. Valores das variáveis sanguíneas da série vermelha e branca de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de recuperação do imidacloprid.

Parâmetro/Células	NTRAT	TRAT	EXP	SAD
Hematócrito (%)	34,83333	33,72222	33,44444	33,27778
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	5,105616 a	5,304491 a	3,958652 b	5,391928 a
VCM (fL)	224,9937	211,9783	204,9979	213,0246
CHCM (g dL ⁻¹)	14,65453 ab	15,73039 a	11,94808 b	16,17582 a
Eritrócitos (10 ³ µ L ⁻¹)	1619444	1638889	1647778	163833
Trombócitos	8748,68	10651,77	12776,59	14068,20
Leucócitos	21177,71	23529,16	23627,70	23193,24
Linfócitos	17315,19	19714,55	17662,72	17128,15
Monócitos	758,204	1045,682	1326,919	719,240
Neutrófilos	784,4233	593,0457	867,1409	825,6360
Eosinófilos	258,3291	119,6137	178,4294	406,5404
CGE	156,9983	54,8951	275,4357	155,5971
Linfócito imaturo	1818,780	2001,373	1680,213	1354,188

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

Tabela 6. Valores das variáveis séricas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de recuperação do imidacloprid.

Parâmetro	NTRAT	TRAT	EXP	SAD
Burst	0,521111	0,519778	0,549111	0,510556
Lisozima	0,000589	0,000478	0,000406	0,000683
Proteína	3,216667	3,483333	3,416667	3,388889
Osmolaridade	276,2222	278,7500	274,1111	271,5556
Sódio (Na ⁺)	196,1111	166,8889	171,6667	201,4444
Potássio (K ⁺)	2,577778	2,222222	1,800000	1,833333
Cloreto (Cl ⁻)	311,8444	408,0148	367,7037	390,3259

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

4. DISCUSSÃO

Neste estudo ocorreu alta variação no número de parasitos por peixe amostrado nos experimentos preliminares e definitivo de eficácia. Segundo Arneberg et al. (1998) e Poulin, (2000) esta variação é semelhante ao ambiente natural, onde populações de parasitos geralmente mostram uma distribuição agregada em populações de acolhimento (presente em poucos indivíduos com alta infestação) devido a fatores como tamanho, peso, densidade do hospedeiro e outros fatores ecológicos

Isto esclarece a alta variação da carga parasitária dos experimentos preliminares ($233,78 \pm 166,81$) em relação ao experimento definitivo ($82,67 \pm 25,41$). Os peixes utilizados no experimento definitivo de eficácia pesavam o dobro ($138,5 \pm 20$ g) dos utilizados nos experimentos preliminares ($60,0 \pm 15$ g). Cauyan et al. (2013) concluíram que os peixes menores tendem a abrigar mais parasitos do aqueles maiores, como detectado pelas correlações lineares que revelaram tais tendências inversas entre a carga parasitária e o tamanho dos peixes.

A redução na carga do monogenético *A. penilabiatum* nas brânquias de *P. mesopotamicus* causada pelo IMD (em 81,32%) foi similar a eficácia do mebendazol ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$ /24 horas de tratamento) com 81,4% de controle em suas brânquias (Martins et al. 2001), ao tiametoxam (81,86%) na concentração de $75,0 \text{ mg L}^{-1}$, com 2 horas de exposição por quatro dias em *P. mesopotamicus* (Carraschi et al. 2014) e ao anestésico eugenol (81,0%) em brânquias de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ por 60 min durante sete dias (Boijink et al. 2015).

O IMD foi mais eficaz que o anti-helmintícos como albendazol (ABZ) (eficácia de 56,9% com 50 e 500 mg L^{-1} de ABZ por 30 minutos durante sete dias) e o praziquantel (PTZ) (redução de 68,3% de *A. penilabiatum* em pacus tratados com 500 mg L^{-1} de PTZ após sete dias) (Onaka et al. 2003).

Cruz et al. (2008) observaram redução de 96,2 e 97,0% de *A. penilabiatum* em *P. mesopotamicus* com $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ de paration metílico por 16 e 24 horas e concentrações de 4,37 e $8,75 \text{ mg L}^{-1}$ de sulfato de cobre foram 100% eficazes no controle de *A. spathulatus* em brânquias e pele de *C. macropomum* (Tavares-Dias

et al. 2011). Apesar da alta redução de monogenéticos, o paration metílico ($3,97 \text{ mg L}^{-1}$) (Cruz et al. 2004) e o sulfato de cobre ($10,36 \text{ mg L}^{-1}$) (Silva et al. 2014) são mais tóxicos que o IMD ($>100,0 \text{ mg L}^{-1}$) para *P. mesopotamicus*. Mesmo o praziquantel, que teve uma redução parasitária menor que o IMD, também apresentou efeitos tóxicos para os peixes e o período de tolerância foi de apenas dois minutos (Onaka et al. 2003). Para Martins, (2004) uma das características essenciais para um produto químico ser utilizado na aquicultura é a baixa toxicidade.

As alterações hematológicas são indicadoras do estado fisiológico do peixe, pois o sangue tem a função de manter a estabilidade dos tecidos e o ambiente interno constante (homeostasia) (Tavares-Dias et al. 2006). A eritrocitose nos peixes infestados e tratados sugerem quadro de hemoconcentração. Para Hemming, (1989) e Houston et al. (1996) esta tendência ocorre em razão dos distúrbios osmorregulatórios e segundo Heath, (1995) este fator ocorre em consequência do aumento da diurese para eliminação dos xenobióticos, e a eritrocitose em situações de estresse agudo, quando o estímulo adrenérgico desencadeia a contração esplênica do baço, liberando grandes quantidades de células vermelhas do sangue para a corrente sanguínea.

A redução no teor de hemoglobina nos peixes do grupo EXP após 14 dias não foi acompanhada por redução do hematócrito, indicando que o volume dos eritrócitos pode ter aumentado como demonstrado pelos valores de VCM, mesmo que não significativos. Isso indica aumento do volume dos eritrócitos e a mobilização pobre de hemoglobina a partir do baço e de outros órgãos hematopoiéticos em *P. mesopotamicus* (Scott e Rogers, 1981). Segundo Heath (1995) o estresse pode causar variação no conteúdo de hemoglobina do peixe, ou ainda, no tamanho dos eritrócitos, como estratégia de adaptação aos estressores.

A variável CHCM é um índice utilizado para avaliação do grau de anemia, e é calculada a partir da concentração de hemoglobina e do valor de volume globular. (Labarrère et al. 2012). De acordo com Ranzani-Paiva et al. (1999) que descreveram o padrão para *P. mesopotamicus* é entre $20,0$ e $28,4 \text{ g dL}^{-1}$. Apesar da redução do CHCM de $16,17582$ no SAD para $11,94808$ no EXP, esse índice

mostra que os peixes de todos os tratamentos estão com valores abaixo da faixa de normalidade para o pacu.

Os estímulos estressantes como a presença de patógenos e a exposição aos fármacos podem aumentar a concentração sanguínea de catecolaminas, resultando em alterações nas variáveis sanguíneas (Labarrère et al. 2012). Dessa forma, a redução do CHCM é resultado da redução no teor de hemoglobina, juntamente com a hemoconcentração em decorrência das catecolaminas. O quadro de anemia é descrito para *P. mesopotamicus* após infecção experimental com a bactéria *Aeromonas hydrophila* (Garcia e Moraes, 2009).

A eficácia do IMD (81,32%) foi acima da recomendada para o Mercosul (2012) para a comercialização do produto anti-helmíntico (> 80%). No entanto, a Secretaria de Defesa Agropecuária Brasileira (Brasil, 1997) determina que o registro de produtos anti-parasitários requer uma eficácia comprovada acima de 95%. Assim, mais estudos devem ser realizados para que o IMD possa atender ao mercado brasileiro.

5. CONCLUSÃO

O inseticida Imidacloprid possui potencial para ser utilizado na aquicultura brasileira, pois reduziu significativamente a infestação do monogenético *A. penilabiatus* em brânquias de *P. mesopotamicus*. No entanto, 14 dias após o tratamento foram observadas alterações nas variáveis hematológicas. Sendo assim, estudos visando um período de recuperação maior devem ser realizados para verificar a reversibilidade do quadro anêmico dos peixes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abimorad, E. G., Ducatti, C., Castellani, D., Jomori, R. K., Portella, M. C., Carneiro, D. J., 2014. The use of stable isotopes to investigate the effects of supplemental lysine and methionine on protein turnover and amino acid utilization in pacu, *Piaractus mesopotamicus*, juveniles. *Aquaculture*. 433: 119-124.

- Anderson, D.P., Siwicki, A.K., 1994. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M.; Arthur, J.R.; Subasinghe, R.P. (Ed.) Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section. Asian Fisheries Society. 185-202.
- Benavides-González, F., Gomez-Flores, R. A., Rábago-Castro, J. L., Sánchez-Martínez, J. G., Montelongo-Alfaro, I. O., 2015. Effects of Hydrogen Peroxide and Metrifonate on Monogenean *Ligictaluridus floridanus* on Catfish (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque) Gills. Journal of Parasitology. 101(6): 707-710.
- Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Saita, M. V., Gimbo, R. Y., Urbinati, E. C., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. Brazilian Journal of Biology. 73(2): 425-429.
- Boijink, C. L., da Cunha Miranda, W. S., Chagas, E. C., Dairiki, J. K., Inoue, L. A. K. A. (2015). Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. Aquaculture. 438: 138-140.
- Brasil, 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria, n. 48, de 12 de maio de 1997. Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. 15p.
- Carraschi, S.P., Cruz, C., Machado Neto, J. G., Castro, M. P., Bortoluzzi, N. L., Girio, A. C. F., 2011. Eficácia do florfenicol e da oxitetraciclina no controle de *Aeromonas hydrophila* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia. 63(3): 579-583.
- Carraschi, S. P., Barbuio, R., Ikefuti, C. V., Florêncio, T., da Cruz, C., Ranzani-Paiva, M. J. T., 2014. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. Aquaculture. 431: 124-128.
- Cauyan, G., Briones, J. C., Leon, E. D., Gonong, J. A., Pasumbal, E. O., Pelayo Ma, C. I., Piñera, M. A., Papa, R. D., 2013. Initial assessment of parasite load in *Clarias batrachus*, *Glossogobius giuris* and *Oreochromis niloticus* in Lake Taal (Philippines). Philippine Science Letters. 6(1): 21-28.

Conroy, G., Conroy, D. A., 2004. Patologia de tilápias: uma reseña general. In: Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemoto, R. M., Lizama, M. A. P. (Ed.). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Livraria Varela. 121-141p.

Cruz, C., Machado-Neto, J. G., Menezes, M. L. D., 2004. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadiractina indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Pesticidas. 14: 93-102.

Cruz, C., Machado Neto, J. G., Fujimoto R. Y., Henares, M. N. P., Duó. D. A., 2008. Eficácia do paration metílico e do extrato aquoso de folhas secas de nim no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (monogenoidea) em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Boletim do Instituto de Pesca. 34(1): 61-69.

Forwood, J. M., Harris, J. O., Deveney, M. R., 2013. Efficacy of bath and orally administered praziquantel and fenbendazole against *Lepidotrema bidyana* Murray, a monogenean parasite of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). Journal of Fish Diseases. 36(11): 939-947.

Franceschini, L., Zago, A. C., Schalch, S. H. C., Garcia, F., Romera, D. M., Silva, R. J. D., 2013. Parasitic infections of *Piaractus mesopotamicus* and hybrid (*P. mesopotamicus x Piaractus brachypomus*) cultured in Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 22(3): 407-414.

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

Heming, T. A., 1989. Clinical studies of fish blood: importance of sample collection and mensurement techniques. American Journal Veterinary Research. 50: 93-97.

Houston, A.H., Roberts. W.C., Kennington. J. A., 1996 Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish *Carassius auratus* L. Fish Physiology Biochemistry. 15: 481-489.

Hrubec, T. C., Smith, S., 1998. Hematology of fish. In: Schalm's Veterinary Hematology 5ªed. 1120-1125p.

Jerônimo, G. T., Pádua, S. B., Bampi, D., Gonçalves, E., Garcia, P., Ishikawa, M. M., Martins, M. L., 2014. Haematological and histopathological analysis in South American

fish *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). Brazilian Journal of Biology. 74(4): 1000-1006.

Jomori, R. K., Carneiro, D. J., Martins, M. I. E. G., Portella, M. C., 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. Aquaculture. 243(1): 175-183.

Labarrère, C. R., Faria, P. M. C., Teixeira, E. A., Melo, M. M., 2012. Erythrogram of hybrids surubins (*Pseudoplatystoma coruscans* X *P. reticulatum*) kept at different stocking densities. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 6(24): 510-514.

Katharios, P., Papandroulakis, N., Divanach, P., 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. Aquaculture. 251(2): 167-171.

Klein, J., 1990. Immunology. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. p.311-334.

Martins, M. L., Onaka, E. M., Moraes, F. R., Fujimoto, R. Y. (2001). Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. Acta Parasitologica. 46(4): 332-336.

Martins, M. L., Onaka, E. M., Moraes, F. R., Bozzo, F. R., Paiva, A. M. F. C., Gonçalves, A., 2002. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of São Paulo, Brazil. Acta Scientiarum. 24: 981-985.

Martins, M. L., 2004. Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na Aquicultura Brasileira. In: Ranzani-Paiva, M. J. T., Takemoto, R. M., Lizama, M. A. P. (eds.). Sanidade de Organismos Aquáticos. p.357-370.

Mercosul., 2012. Standards Mercosul to parasiticide products register. Regulation technic for licensing and renovation of the antiparasites products permission of veterinary use. Ordinance 048. 3p.

Nauen, R., Bretschneider, T., 2002. New modes of action of insecticides. Pesticides. Outlook. 12: 241-245.

Onaka, E., Martins, M. L., Moraes, F., 2003. Eficácia do Albendazol e Praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogiridae), parasito de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) I. banhos terapêuticos. Boletim do Instituto de Pesca. 29(2): 101-107.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Salles, F. A., Eiras, J. C., Eiras, A. C., Ishikawa, C. M., Alexandrino, A. C., 1999. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do instituto de pesca, estado de São Paulo. Boletim do Instituto de Pesca. 25: 77-83.

Rosenfeld, G., 1947. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Memórias do Instituto Butantã. 20:315-28.

Schalch, S. H. C., Moraes, F. R. D., Soares, V. E., 2009. Praziquantel, levamisole and diflubenzuron in the control of *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) and *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) in *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 18(1): 53-59.

Scott, A. L., Rogers, W. A., 1981. Haematological effects of prolonged sublethal hypoxia on channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Fish Biology. 18(5): 591-601.

Sharp, N. J., Diggles, B. K., Poortenaar, C. W., Willis, T. J., 2004. Efficacy of Aquis, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriola* and *Zeuxapta seriola*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. Aquaculture. 236(1): 67-83.

Shulman, S. S., 1961. Specificity of fishes parasites. In: Dogiel, V. A., Petrushevski, G. K., Polyanski, Y. I. (eds). Parasitology of fishes. 104-116p.

Silva, A. F., da Cruz, C., de Rezende, F. R. L., Yamauchi, A. K. F., Pitelli, R. A., 2014. Ecotoxicidade aguda e risco ambiental do sulfato de cobre para peixes tropicais. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 36(4): 377-381.

Tavares-Dias M., 2006. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*. 68: 1822-1833.

Tavares-Dias, M., Ferreira, J. S., Affonso, E. G., Ono, E. A., Martins, M. L., 2011. Toxicity and Effects of Copper Sulfate on Parasitic Control And Hematological Response of Tambaqui *Colossoma macropomum*. *Boletim do Instituto de Pesca*. 37(4): 355-365.

Zhang, X. P., Li, W. X., Ai, T. S., Zou, H., Wu, S. G., Wang, G. T., 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture*. 420: 302-307.

**RESPOSTAS HEMATOIMUNOLÓGICAS DE *Piaractus mesopotamicus*
INFECTADOS COM *Aeromonas hydrophila* E TRATADOS COM
ASSOCIAÇÃO DE SULFADIMETOXINA E METRONIDAZOL**

Cynthia Venâncio Ikefuti^{1,2}; Natália Sayuri Shiogiri³; Roberto Barbuio²; Claudinei da Cruz^{2,4}; Maria José Tavares Ranzani-Paiva⁵

¹ Centro de Aquicultura da Unesp – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 São Paulo, São Paulo, Brasil. Email: cynthia.ikefuti@gmail.com *autor correspondente

² Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luiz, km 235, 13565-905 São Carlos, SP, Brasil.

⁴ Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia de Agrotóxicos – LEEA da Fundação Educacional de Barretos, Barretos, SP, Brasil.

⁵ Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos – CPDPO, Instituto de Pesca, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO – Neste estudo foi avaliado a eficácia de controle da bactéria *Aeromonas hydrophila* pela associação sulfadimetoxina + metronidazol (SM) e os efeitos nas variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e imunológicas de *Piaractus mesopotamicus*. O experimento foi conduzido por 21 dias, com cinco tratamentos e seis réplicas. Após sete dias de tratamento, foi observado o crescimento de unidades formadoras de colônias (UFCs) somente nas amostras reisoladas dos peixes sadios e infectados não tratados e redução do número de eosinófilos de todos os tratamentos em relação ao controle e aumento dos íons Na⁺ nos peixes infectados e tratados com SM. Após 14 dias, ocorreu redução dos valores do burst dos peixes de todos os tratamentos em relação ao controle sadio. Não ocorreu alteração nas variáveis físicas e químicas da água. A associação de

antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol controlou o crescimento da bactéria *A. hydrophila* em pacu e causou alterações nas variáveis hematoimunológicas e iônicas após sete e 14 dias.

Palavras-chave: Eficácia; recuperação, bacteriose, peixe neotropical.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento significativo da produtividade aquícola se deve pela intensificação dos sistemas de produção (Santos et al. 2013). Estes fatores aliados às mudanças bruscas da temperatura e excesso de resíduos metabólicos causam estresse, interferindo na sua imunidade e favorecendo quadros de infecções causadas por bactérias oportunistas (Dos Santos et al. 2014).

Os gêneros *Aeromonas* e *Pseudomonas* classicamente são conhecidos como táxons que agrupam o maior número de espécies denominadas de patógenos oportunistas (Saavedra et al. 2004). Dentre as bactérias do gênero *Aeromonas*, a espécie de maior importância para piscicultura é a *Aeromonas hydrophila* por sua alta patogenicidade (Nam e Joh, 2007).

A *A. hydrophila* é um bastonete móvel Gram-negativo presente na superfície corpórea e brânquias de peixes. São anaeróbicas facultativas, de oxidase positiva que causam septicemia hemorrágica (Kozinska, 2007). Esta enfermidade é caracterizada pela perda de apetite, apatia, despigmentação, corrosão da nadadeira caudal, petéquias, e internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e necrose no fígado e rins (Plumb, 1994; Kozinska, 2007; Carraschi et al. 2011).

A expansão da aquicultura tem provocado o aumento da utilização de antimicrobianos para o controle de bactérias. Uma das formas de controle destes patógenos é a utilização da associação da sulfonamida sulfadimetoxina [4-amino-N-(2,6-dimetoxi-4-pyrimidinil)] com imidazól metronidazol [1: etil (2-hidroxi)-2-metil-5-nitroimidazol]. Essa associação se justifica devido ao seu amplo espectro de ação, pois, a sulfadimetoxina é um antimicrobiano que atua contra bactérias

gram-positivas e negativas e protozoários e, o metronidazol é eficaz no controle de protozoários ciliados e bactérias anaeróbias (Cepav, 2015).

Os antibióticos são utilizados na forma de banho e adicionados à ração, sendo lançados em grandes quantidades nas pisciculturas e nos corpos hídricos (Carraschi et al. 2011). Assim, é necessário o desenvolvimento de protocolos de tratamento seguros e específicos, verificando a eficácia e também a recuperação de peixes neotropicais, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), uma das espécies mais importantes para a piscicultura brasileira (Biller-Takahashi et al. 2015).

Assim, os objetivos deste trabalho foram verificar a eficácia e a recuperação (14 dias) de *P. mesotamicus* infectados experimentalmente com a bactéria *A. hydrophila* e tratados com a Sulfadimetoxina + Metronidazol pelo monitoramento das variáveis físicas e químicas da água e das alterações histopatológicas, hematológicas, bioquímicas, imunológicas e osmo-iônicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

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

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, sob o número de protocolo 01116/14.

As cepas de *A. hydrophila* foram cedidas pela Prevet[®] Sanidade Aquícola e a associação de antimicrobiano Sulfadimetoxina + Metronidazol (50% de cada ingrediente ativo) foi fornecida pela Cepav Pharma Ltda.

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste F para verificar a homogeneidade dos dados e o teste Tukey para verificar as diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$).

2.1. Infecção experimental e eficácia de *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*

Para o experimento de eficácia, 150 pacus com peso de $85,36 \pm 15$ g que foram distribuídos em 30 caixas com capacidade de 60 L ($n=5$), com fluxo de água constante em 10 mL s^{-1} . O experimento foi conduzido por 21 dias (sete dias de tratamento com os fármacos e 14 dias de recuperação) em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis réplicas.

Para tanto, o experimento foi constituído de cinco tratamentos (controle sadio (SAD); controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85% (SAL); tratamento com peixes sadios expostos a 50 mg kg^{-1} de SM na ração medicamentosa (EXP); tratamento com peixes infectados com $5,22 \times 10^9$ *A. hydrophila* mL^{-1} e alimentados com ração não medicada (NTRAT); e tratamento com peixes infectados com $5,22 \times 10^9$ *A. hydrophila* mL^{-1} e tratados com 50 mg kg^{-1} de SM na ração (TRAT).

O inóculo de *Aeromonas hydrophila* foi preparado para a infecção experimental com uma amostra da cepa mãe, que foi repicada em meio BHI (brain heart infusion) (Kasvi[®]) e mantida por 24 horas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BOD) à 27°C . Em seguida, destarcou-se após centrifugação, o sobrenadante e o pellet, que é relativo ao crescimento da bactéria, ressuspendido em solução salina a 0,85%.

Para a infecção experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína ($1 \text{ g } 15 \text{ L}^{-1}$ de água) e a inoculação de 1,0 mL concentrado de $5,22 \times 10^9$ bactéria mL^{-1} (escala McFarland) foi realizada intramuscular (0,5 mL) e subcutânea (0,5 mL), via injeção intracelomática nos peixes dos tratamentos NTRAT e TRAT.

Para a contagem e conversão do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de inóculo, as culturas foram diluídas dez vezes de forma seriada em solução salina e adicionado 0,1 mL da última diluição em placa de ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina para a *A. hydrophila*.

Os peixes foram alimentados com 2% da massa corpórea com ração duas vezes ao dia durante os 21 dias de experimento. A ração comercial utilizada foi a ração Fri-Aqua (Fri-ribe®), com 28% de proteína bruta. Para a produção da ração medicamentosa, foram adicionados 50 mg de sulfadimetoxina + metronidazol para cada quilo, dissolvida em 2% de óleo vegetal.

Durante os sete dias de tratamento (experimento de eficácia), os peixes do EXP e TRAT foram alimentados com ração medicamentosa enquanto o SAD, SAL e NTRAT foram alimentados com ração comercial. A partir do oitavo dia até o final (experimento de recuperação) todos os tratamentos foram alimentados apenas com ração comercial.

A mortalidade foi monitorada diariamente e as variáveis físicas e químicas da água: temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) foram mensuradas minutos antes e imediatamente após da primeira aplicação e 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias com o auxílio de um aparelho de multiparâmetros YSI Professional Plus®.

2.2. Reisolamento de *Aeromonas* sp.

No oitavo dia, foram coletadas amostras assépticas de fígado, rins e baço de cinco peixes dos tratamentos SAD, NTRAT e TRAT para reisolamento. As amostras do rim foram coletadas por meio de “swab” e de fígado e baço por *imprint* destes órgãos. Essas amostras foram coletadas em placas contendo meio TSA e incubadas em BOD por 24 horas a 27 °C.

As culturas obtidas foram repicadas em ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina, selecionadas e quantificadas as colônias amareladas e com halo transparente, que são sugestivas de *Aeromonas* sp (Garcia e Moraes, 2009).

A seguir, realizou-se esfregaços das colônias características e coradas pela técnica de Gram e as culturas que apresentarem bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas foram repicadas em ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) (Saad et al. 1995).

Em seguida, foram submetidas às provas de catalase e oxidase, para identificação do gênero seguindo esquema de caracterização adotado por Popoff, (1984). A prova da catalase foi realizada pela reação do peróxido de hidrogênio com uma colônia de bactéria característica, o resultado é considerado positivo se ocorrer desprendimento de oxigênio dessa reação.

A prova da oxidase foi realizada através de esfregaços das culturas de bactérias, com a utilização de alça de platina, em fitas para prova da oxidase (Newprov[®]). Foram consideradas positivas as culturas cujos esfregaços apresentaram coloração púrpura após alguns segundos. Os cultivos que apresentaram as características de catalase e oxidase positiva foram considerados como de *Aeromonas* sp.

2.3. Variáveis hematológicas, bioquímicas e osmo-iônicas

Um dia após o final do período de tratamento (oitavo dia), foi coletada uma amostra de sangue de nove peixes de três réplicas cada tratamento. No final do experimento de recuperação (dia 21), foram selecionados nove peixes das três réplicas restantes de cada tratamento para a coleta de sangue.

As aliquotas de sangue foram retiradas via punção do vaso caudal com o auxílio de duas seringas (uma heparinizada para obtenção do plasma e uma não heparinizada para a obtenção do soro) para determinação das variáveis sanguíneas, glicose e *burst* respiratório.

O plasma e o soro foram removidos do sangue remanescente centrifugado. O plasma sanguíneo foi coletado e armazenado em freezer convencional (-20 °C) para as análises de osmolalidade e íons plasmáticos (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) e o soro sanguíneo foi coletado e congelado a -80 °C para análise de lisozima.

As variáveis hematológicas: o número de eritrócitos (RBC) (n mm⁻³) estimado utilizando solução salina 0,7% e câmara de Neubauer; o hematócrito (Hct) (%) determinado pelo método de microhematócrito e a hemoglobina (Hb) (g 100 mL⁻¹) determinada pela cianometahemoglobina e leitura em espectrofotômetro em 540 nm. Os valores de RBC, Hct e Hb foram utilizados para

o cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM, fL) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM, g dL⁻¹).

A contagem total e diferencial de leucócitos (monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e leucócitos imaturos) e trombócitos foram efetuadas em extensões sanguíneas coradas com MGGW (May Grünwald-Giemsa-Wright) (Rosenfeld, 1947) e o número absoluto de leucócitos e de trombócitos estimado pelo método indireto (Hrubec e Smith, 1998).

As proteínas totais foram analisadas por refratômetro. A osmolalidade plasmática foi determinada utilizando um semi-microsmômetro (μOSMETTE precision system) que tem como base o ponto de congelamento e foi expressa em mOsmol kg⁻¹.

As concentrações de íons Na⁺ e K⁺ foram determinadas com o auxílio de um fotômetro de chama (DIGMED DM-61), na proporção 1:100 de plasma e água destilada. A concentração de íons Cl⁻ foi determinada utilizando um kit comercial (LABTEST) com absorvância de 490 nm, em uma leitora de microplaca (MRX-HD-DYNEX). As concentrações de íons foram expressas em mEq L⁻¹.

2.4. Resposta imune inata e glicemia

A atividade respiratória dos leucócitos (*burst* respiratório) foi determinada segundo protocolo de Anderson e Siwichi, (1994) modificado por Biller-Takahashi, (2013). O método determina as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo *burst* respiratório através do ensaio colorimétrico baseado na redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT) (Klein, 1990). A concentração de lisozima sérica foi determinada baseada na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* (Demers e Bayne, 1997).

A glicemia foi mensurada em sensor portátil da marca Accu-Chek Advantage1 que determina a glicemia por variação elétrica gerada após a reação da glicose com a enzima glicose desidrogenase, presente nas tiras reagentes. A corrente elétrica gerada por essa reação é proporcional à quantidade de glicose da amostra, que é medida em mg dL⁻¹ (De Paiva, 2007).

3. RESULTADOS

3.1. Eficácia da sulfadimetoxina + metronidazol e variáveis físicas e químicas da água

Apenas uma unidade formadora de colônia (UFC) foi quantificada no baço de um indivíduo no grupo SAD. No grupo NTRAT foram quantificadas no total cinco UFCs nos rins, 42 no fígado e 10 no UFC no baço. Não foram quantificadas UFCs no grupo de peixes infectados e tratados (TRAT) (Tabela 1).

Tabela 1. Valor total, eficácia e valores médios e desvio padrão de unidades formadoras de colônias (UFC) reisoladas de rins, fígado e baço de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de eficácia da SM.

Órgão/Trat.	SAD	NTRAT	TRAT
VT (UFC)	1,0	57,0	0,0
Eficácia (%)	-	-	100
Rins	0,0	1,0 ± 1,73	0,0
Fígado	0,0	8,4 ± 12,82	0,0
Baço	0,2 ± 0,45	2,0 ± 3,08	0,0

Trat. = Tratamento; SAD = grupo sadio; NTRAT = grupo infectado com $5,22 \times 10^9$ *A. hydrophila* mL⁻¹ e não tratado; TRAT = grupo infectado com $5,22 \times 10^9$ *A. hydrophila* mL⁻¹ e tratado com 50 mg kg⁻¹ de SM; VT = Valor total.

Todas as provas realizadas foram sugestivas de *Aeromonas* sp. As colônias que cresceram nas placas com ágar vermelho de fenol e ágar dextrina apresentaram-se amareladas, com halo transparente devido à hidrólise do amido (ágar vermelho de fenol) ou da hidrólise da dextrina (ágar dextrina).

As culturas que comprovaram ser Gram-negativas apresentavam na forma de bastonetes retos e curtos, aos pares, isolados ou em cadeias curtas. O resultado das provas de catalase e oxidase também foram positivos, pois ocorreu desprendimento de oxigênio no primeiro teste e os esfregaços apresentaram coloração púrpura no segundo teste.

Durante o experimento de eficácia não ocorreu mortalidade dos peixes e as variáveis físicas e químicas da água não foram alteradas. A temperatura média foi de $27,14 \pm 0,53$ °C; a condutividade elétrica da água de $176,0 \pm 9,38$ µS cm⁻¹; o oxigênio dissolvido na água de $2,3 \pm 0,94$ mg L⁻¹ e o pH de $8,0 \pm 0,15$.

3.2. Variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata após o experimento de eficácia

Durante o experimento, foi observada coloração enegrecida da derme nos peixes dos tratamentos SAL e NTRAT e redução do número de eosinófilos de todos os tratamentos em relação ao controle no final do tratamento (Tabela 2). Em relação aos íons, os valores de Na^+ foram maiores no tratamento TRAT (Tabela 3). Não ocorreu variação significativa nos demais parâmetros.

Tabela 2. Valores das variáveis sanguíneas da série vermelha e branca de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de eficácia da SM.

Parâmetro/Células	SAL	NTRAT	TRAT	EXP	SAD
Hematócrito (%)	27,06250	26,31250	23,75000	25,43750	23,00000
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	7,547199	7,163378	7,360110	7,003291	6,563536
VCM (fL)	192,6544	199,6571	198,6635	187,9002	185,9110
CHCM (g dL ⁻¹)	28,08958	27,50075	31,09605	28,19981	28,71268
Eritrócitos (10 ³ µL ⁻¹)	2032,250	2047,625	2037,875	2035,000	2035,000
Trombócitos	14025,78	9572,75	15438,21	14092,52	17082,08
Leucócitos	18227,06	13134,16	19033,22	20162,30	22124,82
Linfócitos	10072,78	6994,43	16027,20	16149,90	16679,39
Monócitos	1119,930	386,592	515,286	932,037	1552,141
Neutrófilos	2744,054 b	786,865 ab	240,553 a	942,076 ab	1191,381ab
Eosinófilos	151,5082 b	118,7695 b	103,2073 b	157,9458 b	604,7187 a
CGE	871,532	336,628	405,268	771,450	1245,598
Leucócito imaturo	3256,200	933,903	1728,805	1620,052	1348,983

SAL = controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85%; EXP = tratamento com peixes sadios expostos a 50 mg kg⁻¹ de SM na ração medicamentosa; NTRAT = grupo infectado com 5,22 x 10⁹ *A. hydrophila* mL⁻¹ e não tratado; TRAT = grupo infectado com 5,22 x 10⁹ *A. hydrophila* mL⁻¹ e tratado com 50 mg kg⁻¹ de SM; SAD = grupo sadio. Células Granulocíticas Especiais (CGE). Valores seguidos por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 3. Valores das variáveis séricas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de eficácia da SM.

Parâmetro	SAL	NTRAT	TRAT	EXP	SAD
Burst	0,584375 ab	0,542000 ab	0,524125 a	0,637875 b	0,604125 ab
Lisozima	0,000550	0,000539	0,000425	0,000422	0,000375
Proteína	3,166667	2,888889	2,744444	2,800000	5,188889
Glicose	72,50000	75,87500	64,50000	59,12500	76,83333
Osmolaridade	260,5000	247,6250	245,6250	271,7500	260,0000
Sódio (Na⁺)	147,7500 c	191,3750 ab	209,5714 a	151,7500 bc	158,3750 bc
Potássio (K⁺)	2,050000	2,362500	1,375000	1,462500	1,662500
Cloreto (Cl⁻)	309,4593 a	341,2519 a	346,4889 a	362,7185 a	334,0593 a

SAL = controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85%; EXP = tratamento com peixes sadios expostos a 50 mg kg⁻¹ de SM na ração medicamentosa; NTRAT = grupo infectado com 5,22 x 10⁹ *A. hydrophila* mL⁻¹ e não tratado; TRAT = grupo infectado com 5,22 x 10⁹ *A. hydrophila* mL⁻¹ e tratado com 50 mg kg⁻¹ de SM; SAD = grupo sadio. Valores seguidos por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

3.3. Variáveis hematológicas, bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata após o experimento de recuperação

Durante o experimento de recuperação não ocorreu mortalidade dos peixes e as variáveis físicas e químicas da água não foram alteradas. A temperatura média foi de 27,17 ± 1,42 °C; a condutividade elétrica da água de 181,1 ± 8,84 µS cm⁻¹; o oxigênio dissolvido na água de 3,7 ± 1,10 mg L⁻¹ e o pH foi 8,1 ± 0,15.

Após 14 dias do final do tratamento foi observada redução significativa dos valores do burst dos peixes de todos os tratamentos em relação ao controle sadio (Tabela 5). Não ocorreu variação significativa nos demais parâmetros (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Valores das variáveis da série vermelha e branca de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de recuperação da SM.

Parâmetro/Células	SAL	NTRAT	TRAT	EXP	SAD
Hematócrito (%)	30,66667	30,94444	39,50000	33,33333	30,55556
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	10,13408	9,59403	9,48602	8,51907	10,18723
VCM (fL)	197,3208	181,5934	199,1538	183,5950	182,2734
CHCM (g dL ⁻¹)	33,22553	31,18948	30,25187	25,75755	33,61279
Eritrócitos (10 ³ µ L ⁻¹)	1606111	1736667	1635556	1842778	1714444
Trombócitos	11772,92	11970,12	10228,38	12409,95	14335,32
Leucócitos	19887,36 ab	21731,94 a	14486,57 b	18804,70 ab	19100,87 ab
Linfócitos	8478,11 b	16976,91 a	9287,35 b	14532,54 ab	12050,39 ab
Monócitos	593,582	907,693	526,551	1028,454	905,443
Neutrófilos	1873,600	1040,745	808,108	895,019	2269,406
Eosinófilos	219,1940	271,0366	154,7225	159,3386	261,5542
CGE	584,2528	509,1399	335,3117	502,8162	520,4922
Leucócito imaturo	1035,560	2008,725	1764,903	1715,644	1027,113

SAL = controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85%; EXP = tratamento com peixes sadios expostos a 50 mg kg⁻¹ de SM na ração medicamentosa; NTRAT = grupo infectado com 5,22 x 10⁹ *A. hydrophila* mL⁻¹ e não tratado; TRAT = grupo infectado com 5,22 x 10⁹ *A. hydrophila* mL⁻¹ e tratado com 50 mg kg⁻¹ de SM; SAD = grupo sadio. Células Granulocíticas Especiais (CGE). Valores seguidos por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 5. Valores das variáveis bioquímicas, osmo-iônicas e resposta imune inata de pacu, *P. mesopotamicus* no final do experimento de recuperação da SM.

Parâmetro	SAL	NTRAT	TRAT	EXP	SAD
Burst	0,517889 b	0,529889 b	0,519778 b	0,550625 b	0,689333 a
Lisozima	0,000833 a	0,000506 b	0,000656 ab	0,000506 b	0,000571 ab
Proteína	3,15000	2,63333	13,84444	3,15556	3,49444
Glicose	57,44444	47,22222	68,88889	54,88889	66,44444
Osmolaridade	261,5556 b	270,8889 ab	263,5556 ab	274,7778 a	273,4444 ab
Sódio (Na ⁺)	155,2222	169,0000	167,0000	174,5000	169,0000
Potássio (K ⁺)	1,877778	1,877778	1,911111	1,412500	2,066667
Cloreto (Cl ⁻)	305,5556	272,0370	315,8741	302,0963	312,7259

SAL = controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85%; EXP = tratamento com peixes sadios expostos a 50 mg kg⁻¹ de SM na ração medicamentosa; NTRAT = grupo infectado com 5,22 x 10⁹ *A. hydrophila* mL⁻¹ e não tratado; TRAT = grupo infectado com 5,22 x 10⁹ *A. hydrophila* mL⁻¹ e tratado com 50 mg kg⁻¹ de SM; SAD = grupo sadio. Valores seguidos por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo ocorreu eficácia da associação dos antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol (SM) no controle de *Aeromonas* sp. em *P. mesopotamicus*, assim como, o florfenicol ($10,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e enrofloxacin (90,0 mg L^{-1}) no controle de *Aeromonas* sp. em *Piaractus mesopotamicus* (Carraschi et al. 2014).

O florfenicol também foi eficaz via oral no tratamento de enfermidades causadas por *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *Edwardsiella ictaluri*; *A. hydrophyla* e *Vibrio anguillarum* (Fukui et al. 1987; Inglis et al. 1991; Gaikowski et al. 2003; Nordmo et al. 2006; Seljestokken et al. 2006). Para Carraschi et al. (2011) não ocorreu eficácia da oxitetraciclina adicionada na ração ($170,0 \text{ mg kg}^{-1}$) para o mesmo patógeno e peixe. No entanto, este antibiótico foi 100% eficaz para outras espécies, como o *I. punctatus* no controle de *Aeromonas* sp., com $50,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (Oxytetracycline, 1986) e de *F. columnare*, com $80,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (Tomas-Jinu e Goodwin, 2004).

O escurecimento da epiderme dos peixes dos tratamentos SAL e NTRAT é consequência do maior número de células no local e do aumento de melanóforos. Esta alteração está relacionada à tentativa de regeneração de tecidos danificados (Secombes, 1996), à determinação da hierarquia social e condição de estresse (Beeching, 1995) e à bacterioeses como a aremonose (Garcia e Moraes, 2009).

As alterações hematológicas ocasionadas pelas doenças bacterianas variam de acordo com o agente etiológico e dependem da patogenicidade e virulência da bactéria (Dias et al. 2009). Os altos valores de eosinófilos verificados nos peixes do grupo SAD é característica inerente da espécie (Ranzani-Paiva et al. 1999). Porém, a eosinopenia, sugere não ser um distúrbio, uma vez que, a ausência ou a baixa frequência destas células no sangue de teleósteos é normal (Tavares-Dias e Moraes, 2003). Garcia e Moraes (2009) também observaram redução do número de eosinófilos 24h após inoculação intraperitoneal de $6,0 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *A. hydrophila* em pacu.

A perda de íons é uma resposta compensatória à infestação pelo patógeno, pelo estresse causado pelo mesmo ao hospedeiro e também devido aos danos

nos tecidos dos peixes, principalmente nas brânquias, provocados por agentes externos (Ewing et al. 1994; Tumbol et al. 2001), como a presença de fármacos na água. No entanto, foi observado aumento de íons Na^+ nos peixes do grupo TRAT. Essa alteração pode ser explicada pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, permitindo que o Na^+ intracelular se difunda passivamente para o fluido extracelular (Laurén e McDonald, 1985; Perry e Laurent, 1993). Segundo Tumbol et al. (2001) os peixes que sobrevivem às enfermidades são capazes de restaurar os íons até valores positivos após a infestação e subsequente traumas.

Ao final de sete dias de tratamento, foi observado aumento não significativo nos níveis de lisozima em todos os tratamentos em relação ao controle. Segundo Studnicka e Siwicki, (1986) e Siwicki e Studnika, (1987), após a infecção, injeção ou exposição de agentes patogênicos ou material estranho é comum ocorrer aumento na concentração de lisozima no sangue. Han et al. (2014) também observaram redução da atividade de lisozima em *Cyprinus carpio* expostos à $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de metronidazol por 30 dias.

Essa explicação também pode ser utilizada para a redução significativa nos níveis do burst respiratório em todos os tratamentos em relação ao controle observado no experimento de recuperação. Essa imunossupressão pode ter sido acarretada pelo estresse causado pela inoculação de solução salina e bactéria nos peixes dos tratamentos SAL e NTRAT e pela presença da bactéria e da SM no TRAT e EXP. Para restabelecer o equilíbrio osmorregulatório, os peixes gastam energia extra, deprimindo a sua resistência e o seu sistema imunológico (Carneiro e Urbinati, 2001).

5. CONCLUSÃO

A associação de antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol foi eficaz no controle da bactéria *A. hydrophila* em pacu e causou alterações nas variáveis hematológicas e iônicas. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o tempo de recuperação dos peixes, pois estes estavam imunossuprimidos após 14 dias de experimento.

Os esforços para melhorar o desempenho deste farmoquímico seria a inclusão do desenvolvimento de uma formulação específica para a aquicultura, com ajuste das doses utilizadas para o tratamento e determinação de concentrações ativas mais baixas, reduzindo assim a quantidade de produtos químicos espalhados no ambiente aquático.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, D. P., Siwicki, A. K., 1994. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Shariff, M., Arthur, J. R., Subasinghe, R. P. (Ed.) Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 185-202p.

Andrade, L. S., Andrade, R. L. B., Becker, A. G., Baldisseroto, B., 2006. Survival and behavior of silver catfish, *Rhamdia quelen*, submitted to antibiotics and sodium chloride treatments. *Ciência Rural*. 36(3): 1004-1007.

Beeching, S. C., 1995. Colour pattern and inhibition aggression in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Journal of Fish Biology*. 47(1): 50-58.

Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Saita, M. V., Gimbo, R. Y., Urbinati, E. C., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*. 73(2): 425-429.

Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Mingatto, F. E., Urbinati, E. C., 2015. The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Fish & shellfish immunology*. 47(1): 360-367.

Carneiro, P. C. F., Urbinati, E. C., 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research*. 32(4): 297-304.

Carraschi, S. P., Cruz, C., Machado Neto, J. G., Castro, M. P., Bortoluzzi, N. L., Gírio, A. C. F., 2011. Efficacy of the florfenicol and of the oxytetracycline in the control in *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 63(3): 579-583.

Carraschi, S. P., Barbuio, R., Ikefuti, C. V., Florêncio, T., da Cruz, C., Ranzani-Paiva, M. J. T., 2014. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*. 431:124-128.

CEPAV. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ). Giardacid, 2015. Disponível em <http://www.biocom.com.br/giardacid.htm>

Demers, N. E., Bayne, C. J., 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Development and Comparative Immunology*. 21: 363–373.

De Paiva, A. P. O. M., 2007. Avaliação de dois sensores portáteis para mensuração da glicemia em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59(6): 1408-1411.

Dias, M. T. D., Ishikawa, M. M., Martins, M. L., Satake, F., Hisano, H., de Pádua, S. B., Jerônimo, G. T., Sant'ana, A. R., 2009. Hematologia: ferramenta para o monitoramento de estado de saúde de peixes em cultivo. In: Saran-Neto A., Mariano W. S., Pozzobon-Soria S. F. (Org.). *Tópicos especiais em saúde e criação animal*. 1ª ed. São Carlos: Pedro & João Editores. 43- 80p.

Dos Santos, F. G. B., Gouveia, G. V., De França, C. A., De Souza, M. G., Da Costa, M. M., 2014. Microbiota bacteriana com potencial patogênico em pacamã e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. *Revista Caatinga*. 27(2): 176-183.

Ewing, M. S., Kocan, K. M., 1992. Invasion and development strategies of *Ichthyophthirius multifiliis*, a parasitic ciliate of fish. *Parasitology Today*. 8: 204-208.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014
<http://www.onu.org.br/fao-pesca-e-aquicultura-batem-recorde-deproducaoem2013/>

Flajnik, M. F., Du Pasquier, L., 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology*. 25: 640-644.

Fukui H., Fujihara Y., Kano T., 1987. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of florfenicol, a new fluorinated analog of thiamphenicol, against fish pathogens. *Fish Pathology*. 22(4): 201–207.

- Gaikowski, M. P., Wolf, J. C., Endris, R. G., Gingerich, W. H., 2003. Safety of Aquaflor (Florfenicol, 50% Type A Medicated Article), Administered in Feed to Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *Toxicology Pathology*. 3: 689–697.
- Garcia, F., Moraes, F. R., 2009. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 31: 17-21.
- Han, J., Zhang, L., Yang, S., Wang, J., Tan, D., 2014. Detrimental effects of metronidazole on selected innate immunological indicators in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 92(2): 196-201.
- Hrubec, T. C., Smith, S., 1998. Hematology of fish. In: Schalm's Veterinary Hematology 5^aed. 1120-1125p.
- Johansson-Sjöbeck, M. L., Dave, G., Larsson, A., Lewander, K., Lidman, U., 1978. Hematological effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 60(A): 165-168.
- Kozinska, A., 2007. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *Journal of Fish Disease*. 30: 293-301.
- Klein, J., 1990. Immunology. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications. 311-334p.
- Laurén, D. J., McDonald, D. G., 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Comparative Physiology B*. 155(5): 635-644.
- Nam, I., Joh, K., 2007. Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology-Seoul*. 45(4): 297-304.
- Nordmo, R., Varma, K. J., Sutherland, I. H., Brokken, E. S., 2006. Florfenicol in Atlantic salmon, *Salmon salar* L.: field evaluation of efficacy against furunculosis in Norway. *Journal of Fish Disease*. 17: 239–244.
- Oxytetracycline., 1986. In: Code of Federal regulations. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, p.586-589.

- Perry, S. F., Laurent, P., 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In Springer Netherlands (Ed) Fish ecophysiology. p.231-264.
- Pickering, A. D., 1984. Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. Genetic Comparative Endocrinology. 53: 252-259.
- Plumb, J. A., 1994. Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes. CRC Press. 328p.
- Popoff, M., 1984. Genus III. *Aeromonas* Kluwer and Van Niel. In: Drieg, N. R. (Ed). Bergey's manual of systematic bacteriology. p.545-584.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Salles, F. A., Eiras, J. C., Eiras, A. C., Ishikawa, C. M., Alexandrino, A. C., 1999. Análises hematológicas de curimatã (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, estado de São Paulo. Boletim do Instituto de Pesca. 25: 77-83.
- Rosenfeld, G., 1947. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Memórias do Instituto Butantã. 20: 315-328.
- Saad, S. M. I., Iaria, S. T., Furlanetto, S. M. P., 1995. Motile *Aeromonas* spp. in retail vegetables from São Paulo, Brazil. Revista de Microbiologia. 26(1): 22-27.
- Saavedra, M. J., Brito, R. D., Sousa, M., Alves, A., Rema, P., 2004. Isolamento de *Pasteurella* spp. e *Vibrio* spp. em robalos (*Dicentrarchus labrax*) Susceptibilidade a diferentes grupos de antibióticos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 56(2): 277-279.
- Santos, E. F., Tavares-Dias, M., Pinheiro, D. A., Neves, L. R., Marinho, R. D. G. B., Dias, M. K. R., 2013. Parasitic fauna of tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) farmed in cages in the State of Amapá, eastern Amazon. Acta Amazonica. 43(1): 105-111.
- Secombes, C. J., 1996. The fish immune system: the nonspecific immune system – cellular defenses. London: Academic Press: p.63-100.

Seljestokken, B., Bergh, O., Melingen, G. O., Rudra, H., Hetlilidolsen, R., Samuelsen, O. B., 2006. Treating experimentally induced vibriosis (*Listonella anguillarum*) in cod, *Gadus morhua* L., with florfenicol. *Journal of Fish Diseases*. 29: 737–742.

Selye, H., 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*. 1(4667):1383.

Siwicki, A., Studnika, M., 1986. Lysozyme level in carp *Cyprinus carpio*. *Bamidgeh*. 2: 22–26.

Siwicki, A., Studnika, M., 1987. The phagocytic effects of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*. 31: 57–60.

Sumpter, J. P., 1997. The endocrinology of stress. In: Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., Schreck, C. B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press. p.95-117.

Tavares Dias, M., Moraes, F.R., 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: FMRP. 144p.

Tort, L., Sunyer, J. O., Gómez, E., Molinero, A., 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 51(1): 179-188.

Thomas-Jinu, D. C. S., Goodwin, A. E., 2004. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warm water aquaculture ponds. *Journal of Fish Disease*. 27: 23 - 28.

Tumbol, R. A., Powell, M. D. and Nowak, B. F. 2001. Ionic effects of infection of *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish. *Journal of Aquatic Animal Health*. 13: 20-26.

**BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS DE *Piaractus mesopotamicus*
INFECTADOS COM *Anacanthorus penilabiatus* E *Aeromonas hydrophila*,
TRATADOS COM FÁRMACOS E RECUPERADOS**

Cynthia Venâncio Ikefuti^{1,2}; Claudinei da Cruz^{2,3}; Silvia Patrícia Carraschi^{1,2};
Mayara Galatti Tedesque²; Maria José Tavares Ranzani-Paiva⁴

¹ Centro de Aquicultura da Unesp – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 São Paulo, São Paulo, Brasil. Email: cynthia.ikefuti@gmail.com *autor correspondente

² Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia (NEPEAM) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Via de acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 São Paulo, São Paulo, Brasil.

³ Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia de Agrotóxicos – LEEA da Fundação Educacional de Barretos, Barretos, SP, Brasil.

⁴ Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos – CPDPO, Instituto de Pesca, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos histopatológicos em brânquias, fígado e rins de pacu (*P. mesopotamicus*) causados pelo imidacloprid (IMD) e pela associação da sulfadimetoxina e do metronidazol (SM) e/ou patógenos e verificar a recuperação. O experimento eficácia do IMD para o controle de *Anacanthorus penilabiatus* foi conduzido por cinco dias e da SM para tratar *Aeromonas hydrophila* por sete dias. Uma amostra de brânquias, fígado e rins de cinco peixes dos tratamentos de cada droga foi coletada um dia após o final do experimento de eficácia e 14 dias após, para verificar a recuperação dos peixes. Não foram observadas alterações nas amostras de brânquias, fígado e rins dos peixes do controle. Nas brânquias dos peixes dos experimentos de eficácia e recuperação do IMD e da SM ocorreram ondulação das lamelas secundárias, aumento do epitélio interlamelar, edema das lamelas secundárias, presença de parasitos e congestão das lamelas secundárias. No fígado ocorreu

hipertrofia dos hepatócitos, congestão dos capilares sinusóides, aumento do diâmetro dos capilares sinusóides e núcleo deslocado para periferia. Nos rins as alterações foram a vacuolização e oclusão dos túbulos e a retração do glomérulo. A presença dos patógenos *A. penilabiatus* e *A. hydrophila* aliados à exposição aos fármacos causaram alterações em brânquias, fígado e rins de pacus e o período de 14 dias mostrou recuperação inicial de brânquias e rins de *P. mesopotamicus*.

Palavras-chave: Piscicultura; Doença; peixe neotropical.

1. INTRODUÇÃO

As drogas originalmente desenvolvidas para uso na agricultura foram adaptadas para utilização no controle dos patógenos na medicina veterinária e na aquicultura (Banerjee et al. 2014). Um exemplo é o organofosforado triclorfon, utilizado como pesticida em lavouras de soja (Santos, 2015) e antihelmíntico em ovinos (Yoshihara et al. 2013) e peixes (Tokşen et al. 2013; Venturini et al. 2015).

Neste contexto, dois xenobióticos originados da agricultura e da medicina veterinária possuem potencial para o controle de patógenos na aquicultura: o inseticida imidacloprid e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina + metronidazol.

O Imidacloprid (IMD) (1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine) possui potencial na aquicultura para ser utilizado no controle do monogenético *Anacanthorus penilabiatus*. É um inseticida pertencente à classe química dos neonicotinóides que se ligam ao receptor de acetilcolina nicotínico pós-sináptico (nAChRs) em insetos, causando paralisia e morte (Tomizawa et al. 1999). É um dos pesticidas mais utilizados no mundo, registrado para uso em mais de 140 culturas em mais de 120 países (Brittain e Potts, 2011).

A associação da sulfonamida sulfadimetoxina [4-amino-N-(2,6-dimetoxi-4-pirimidinil)] com imidazol metronidazol [1: etil (2-hidroxi)-2-metil-5-nitroimidazol] (SM) é utilizada para o tratamento de giardíase em cães e gatos. Esta associação de antimicrobianos possui potencial para ser utilizado na aquicultura no controle

de bacterioses como a *Aeromonas hydrophila* devido ao seu amplo espectro de ação. A sulfadimetoxina é um antimicrobiano que atua contra bactérias gram-positivas e negativas e protozoários e, o metronidazol é eficaz no controle de protozoários ciliados e bactérias anaeróbias (Cepav, 2015).

Os xenobióticos utilizados na aquicultura, acrescidos dos descartes domésticos e industriais, geram uma pressão antrópica nos ecossistemas aquáticos, desencadeando diferentes mecanismos de toxicidade nos organismos que habitam este ambiente (Rabouille et al. 2006).

Para analisar esses mecanismos, a histologia é uma importante ferramenta para se diagnosticar efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetam os tecidos animais. Por isso é considerada um excelente método de avaliação de bioindicadores de impacto ambiental causado por agentes tóxicos (Heath, 1995; Albinati, 2009). Para as análises histológicas, órgãos de contato direto com o xenobiótico, como as brânquias e os órgãos de metabolismo e excreção, como o fígado e o rim, são os mais indicados para indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica de produtos químicos em tecidos animais.

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos histopatológicos em brânquias, fígado e rins de pacu, *P. mesopotamicus*, causados pelos patógenos e/ou IMD e a SM e verificar se estes são reversíveis após 14 dias do final do tratamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, Nepeam, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Campus de Jaboticabal. A rotina histopatológica foi realizada no Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal.

O imidacloprid (200g L⁻¹ de ingrediente ativo) na formulação Provado[®] foi adquirido de forma comercial. A associação de antimicrobianos Sulfadimetoxina + Metronidazol foi fornecida pela Cepav Pharma Ltda e as cepas de *A. hydrophila* foram cedidas pela Prevet[®] Sanidade Aquícola.

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, sob o número de protocolo 01116/14.

2.1. Eficácia e recuperação do Imidacloprid em *Piaractus mesopotamicus* infestados com *Anacanthorus penilabiatus*

Para o experimento de eficácia, 300 pacus com peso de $138,5 \pm 20$ g foram distribuídos aleatoriamente em 12 tanques com capacidade de 400L ($n=25$), com fluxo de água constante em 10 mL s^{-1} . O experimento teve a duração de 19 dias (cinco dias do experimento de eficácia na forma de banho terapêutico com uma hora de exposição por dia, mais 14 dias do experimento de recuperação) e foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado.

Os tratamentos foram um controle sadio (SAD); um tratamento composto por peixes sadios expostos a $88,0 \text{ mg L}^{-1}$ de imidacloprid na forma de banho terapêutico (EXP) por uma hora; um tratamento composto por peixes infestados com *A. penilabiatus* e não tratados (NTRAT) e um tratamento composto por peixes infestados com *A. penilabiatus* e tratados com $88,0 \text{ mg L}^{-1}$ de imidacloprid na forma de banho terapêutico (TRAT). Todos em triplicata.

Durante 60 dias, os tratamentos NTRAT e TRAT foram mantidos nas seguintes condições: baixa concentração de oxigênio dissolvido ($< 4,0 \text{ mg L}^{-1}$), excesso de matéria orgânica, alimentação a cada 48 horas e com captura periódica. Após esse processo, semanalmente, uma amostragem de cada tanque ($n=2$) destes tratamentos foi submetida à coleta das brânquias para contagem basal de parasitos. Na contagem basal os pacus apresentaram em média $82,67 \pm 25,41$ de monogenéticos peixe⁻¹.

A mortalidade foi monitorada diariamente e as variáveis físicas e químicas da água: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) foram mensuradas antes e imediatamente após da primeira aplicação e 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 19 dias com o auxílio de um aparelho de multiparâmetros YSI Professional Plus®.

2.2. Eficácia e recuperação da sulfadimetoxina + metronidazol em *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Aeromonas hydrophila*

Para o experimento de eficácia, 150 pacus com peso de $85,36 \pm 15$ g foram distribuídos aleatoriamente em 30 caixas com capacidade de 60L (n=5), com fluxo de água constante em 10 mL s^{-1} . O experimento teve a duração de 21 dias (sete dias do experimento de eficácia mais 14 dias do experimento de recuperação) e foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e seis réplicas.

Os tratamentos foram controle sadio (SAD); controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85% (SAL); tratamento composto por peixes sadios expostos a 50 mg kg^{-1} de SM na ração medicamentosa (EXP); tratamento composto por peixes infectados com *A. hydrophila* e alimentados com ração não medicamentosa (NTRAT) e tratamento composto por peixes infectados com *A. hydrophila* e tratados com 50 mg kg^{-1} de SM na ração (TRAT).

Para a infecção experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína ($1 \text{ g } 15 \text{ L}^{-1}$ de água) e inoculação de $1,0 \text{ mL}$ concentrado de $5,22 \times 10^9$ bactéria mL^{-1} (escala McFarland) foi realizada intramuscular ($0,5 \text{ mL}$) e subcutânea ($0,5 \text{ mL}$), via injeção intracelomática nos peixes dos tratamentos NTRAT e TRAT. O inóculo foi obtido após a centrifugação das culturas, o sobrenadante foi descartado e o pellet diluído em solução salina a 0,85%.

Para a contagem e conversão do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de inóculo, as culturas foram diluídas dez vezes de forma seriada em solução salina e adicionado $0,1 \text{ mL}$ da última diluição em placa de ágar vermelho de fenol-amido-ampicilina para a *A. hydrophila*.

Durante os sete dias de tratamento (experimento de eficácia), os peixes do EXP e TRAT foram alimentados com ração medicamentosa enquanto o SAD, SAL e NTRAT foram alimentados com ração comercial. A partir do oitavo dia até o final (experimento de recuperação) todos os tratamentos foram alimentados apenas com ração comercial. Os peixes foram alimentados com 2% da massa corpórea com ração duas vezes ao dia durante os 21 dias de experimento. A ração comercial utilizada foi a ração Fri-ribe® com 28% de proteína bruta e para a

produção da ração medicamentosa, foram adicionados 50 mg de sulfadimetoxina + metronidazol para cada quilo, dissolvida em 2% de óleo vegetal.

A mortalidade foi monitorada diariamente e os as variáveis físicas e químicas da água: temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) e condutividade elétrica (µS cm⁻¹) foram mensuradas antes e imediatamente após da primeira aplicação e 1, 3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias com o auxílio de um aparelho de multiparâmetros YSI Professional Plus®.

2.3. Análises histopatológicas em *Piaractus mesopotamicus*

Uma amostra de brânquias, fígado e rins de cinco peixes de cada tratamento foi coletada um dia após o final do experimento de eficácia e de recuperação de cada droga. Os peixes foram eutanasiados em banho de imersão com benzocaína (1,0 g 15,0 L⁻¹ de água) para a obtenção das amostras para as análises histopatológicas. Os fragmentos de brânquias, fígado e rins foram fixados em formaldeído 10% tamponado (tampão PBS, 0,1M; pH 7,2) por 24 horas.

Após a fixação, os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e inclusão em Histosec® (Merck). Em seguida foi realizada a microtomia em micrótomo automático (Leica, RM-2155) obtendo-se cortes 5 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (H.E) (Behmer et al. 1976) e ácido periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Labomed modelo LX400 em aumento de 100, 200 e 400X.

3. RESULTADOS

A constituição das brânquias dos pacus do grupo controle é composta pela lamela primária, que é constituída por cartilagem que reveste e a sustenta, no seu interior ocorre a presença de um vaso sanguíneo a partir da lamela secundária. Esta é composta por células mucosas e células de sustentação. Entre as lamelas secundárias ocorre a formação do espaço interlamelar composto por células mucosas, células de revestimento e cloreto (Figura 1A).

Histologicamente, o fígado dos peixes no grupo controle apresentou organização cordonal dos hepatócitos formado a partir das veias centrais do órgão.

Os hepatócitos apresentaram citoplasma claro (acidófilo) e núcleo (basófilo) levemente deslocado para a periferia da célula (Figura 2A). Os rins nos animais do grupo controle apresentaram glomérulos e túbulos proximais e distais. No interstício de tecido composto por tecido conjuntivo frouxo, onde ocorre a presença do tecido hematopoiético (Figura 2D).

Nas brânquias dos peixes dos experimentos de eficácia e recuperação do IMD e da SM foram observados ondulação das lamelas secundárias (Figura 1B); presença de parasitos (Figura 1C); aumento do epitélio interlamelar (Figura 1D); edema das lamelas secundárias (Figura 1E) e congestão das lamelas secundárias (Figura 1F) (Tabela 1).

Tabela 1. Respostas histopatológicas observadas em brânquias de *P. mesopotamicus* nos experimentos de eficácia e recuperação com o inseticida imidacloprid e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol.

Experimento	Eficácia IMD				Recup IMD				Eficácia SM				Recup SM			
	SAD	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	EXP	TRAT	NTRAT
Sem alteração	x				x											
Ondulação das lamelas secundárias		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aumento do epitélio interlamelar				x							x	x		x	x	x
Edema das lamelas secundárias																x
Congestão das lamelas secundárias												x				
Presença de parasitos		x	x						x	x	x	x	x	x	x	x

Recup. = Recuperação; SAD = peixes sadios; SAL = controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85%; EXP = peixes sadios expostos ao IMD e SM; TRAT = peixes infestados/infectados e tratados com o IMD e SM; NTRAT = peixes infestados/infectados e não tratados.

No fígado foram observados hipertrofia dos hepatócitos e núcleo deslocado para periferia (Figura 2B); congestão dos capilares sinusóides (Figura 2B); aumento do diâmetro dos capilares sinusóides (Figura 2C) (Tabelas 1 e 2). E nos rins as alterações foram vacuolização dos túbulos (Figura 2E), retração do glomérulo (Figura 2E) e oclusão dos túbulos (Figura 2F) (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Respostas histopatológicas observadas em fígado de *P. mesopotamicus* nos experimentos de eficácia e recuperação com o inseticida imidacloprid e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol.

Experimento	Eficácia IMD				Recup IMD				Eficácia SM				Recup SM					
Alteração/Tratamento	SAD	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	SAL	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	SAL	EXP	TRAT	NTRAT
Sem alteração	x				x				x	x				x	x			
Hipertrofia dos hepatócitos		x	x	x		x	x	x			x	x	x			x	x	x
Núcleo deslocado para periferia			x	x														
Aumento do diâmetro dos capilares sinusóides	x					x	x	x										
Congestão dos capilares sinusóides		x									x	x				x	x	

Recup. = Recuperação; SAD = peixes sadios; SAL = controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85%; EXP = peixes sadios expostos ao IMD e SM; TRAT = peixes infestados/infectados e tratados com o IMD e SM; NTRAT = peixes infestados/infectados e não tratados.

Tabela 3. Respostas histopatológicas observadas em rins de *P. mesopotamicus* nos experimentos de eficácia e recuperação com o inseticida imidacloprid e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina e metronidazol.

Experimento	Eficácia IMD				Recup IMD				Eficácia SM				Recup SM					
Alteração/Tratamento	SAD	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	SAL	EXP	TRAT	NTRAT	SAD	SAL	EXP	TRAT	NTRAT
Sem alteração	x				x				x	x				x	x			
Vacuolização dos túbulos		x	x	x		x	x	x			x	x	x			x	x	x
Retração do glomérulo		x	x	x		x	x	x			x	x	x			x	x	x
Oclusão dos túbulos											x							

Recup. = Recuperação; SAD = peixes sadios; SAL = controle negativo com inoculação de solução salina a 0,85%; EXP = peixes sadios expostos ao IMD e SM; TRAT = peixes infestados/infectados e tratados com o IMD e SM; NTRAT = peixes infestados/infectados e não tratados.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, as alterações nas brânquias, fígado e rins de *P. mesopotamicus* se enquadram nas lesões de primeira e segunda fase proposta por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e adaptada por Meletti et al. 2003. Nestas fases, as alterações são reversíveis uma vez as condições ambientais são melhoradas (Sensini et al. 2008).

Neste estudo observamos que após 14 dias o tratamento com os fármacos ocorreu recuperação inicial nas brânquias dos peixes do experimento com o IMD e dos rins dos peixes do experimento com o IMD e a SM. Segundo Reimschuessel, (2001) e Gernhofer et al. (2001), o processo de regeneração dos tecidos começa geralmente de 2 a 4 semanas após a exposição ao agente estressor e pode demorar até dois meses para ser concluído, daí a ausência de recuperação total neste período. Venturini et al. (2015) também não observaram recuperação total de *P. mesopotamicus* sete dias após a exposição dos peixes ao fenol.

As brânquias apresentam função de regulação osmótica, excreção e respiração nos peixes e são biomarcadores sensíveis às alterações causadas por xenobióticos por estarem em contato direto com a água (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic 1994; Brunelli et al. 2011). As alterações estruturais branquiais comprometem a função do órgão, especialmente, em exposição crônica a níveis subletais (Nogueira et al. 2011).

A ondulação das lamelas secundárias é resultado da exposição das brânquias aos fármacos e/ou aos parasitos. Alterações histopatológicas causadas por monogenéticos se devem principalmente às suas estruturas morfológicas e o modo especializado de fixação nos tecidos do hospedeiro (Kaur e Shrivastav, 2014).

Segundo Wood (1960), os pesticidas causam perda da adesão entre a célula epitelial e o sistema subjacente de células pilares acompanhado por um colapso na integridade estrutural das lamelas secundárias. O efeito secundário da desorganização da estrutura branquial é a menor eficiência na absorção de oxigênio devido ao aumento da distancia de difusão lamelar (Fanta et al. 2003). Essa alteração também ocorreu em *Ictalurus punctatus*, *Notemigonus crysoleucas* e *Pimephales promelas* infestadas com *Centrocestus formosanus* (Andrew et al. 2001); em *Glossogobius giuris* expostos ao óleo de neem (Mamatha e Mohan, 2013); em *Rutilus rutilus* exposto ao diazinon (Katuli et al. 2014); em *R. rutilus* tratados com permanganato de potássio e formoldeído (Ghelichpour et al. 2014) e em *Labeo rohita* infestados com *Paradactylogyrus* sp. (Kaur e Shrivastav, 2014).

A maior parte das lesões causadas por exposições subletais em brânquias afeta epitélio lamelar (Hinton e Lauren, 1990). O edema e o aumento do epitélio interlamelar são consideradas respostas adaptativas e um mecanismo de defesa do indivíduo onde brânquias tentam aumentar a distância entre o ambiente externo e o sangue, servindo assim como uma barreira para a entrada de contaminantes (Sepici-Dinçel et al. 2009). Essas alterações também ocorreram em *Leporinus macrocephalus* expostos ao Diquat (Henares et al. 2007); em *Cichlasoma dimerus* exposto ao endosulfan (Da Cuna et al. 2011); em pacus infectados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com florfenicol (Carraschi et al. 2012); em *Poecilia reticulata* exposta ao herbicida glyphosate (Rocha et al. 2015); em *Oreochromis niloticus* expostas à Sulfluramida (Virgens et al. 2015).

A congestão na lamela secundária pode ser uma tentativa do peixe em diminuir as trocas gasosas, reduzindo a absorção do xenobiótico pela estrutural branquial (Henares et al. 2008). Essa alteração também foi observada em *Oreochromis niloticus* expostos ao Diquat (Henares et al. 2007); em *Carassius auratus* exposto ao zinco (Subburaj et al. 2015) e em *Acanthopagrus bifasciatus*, *Diplodus noct* e *Sparidentex hasta* infestados com *Benedenia acanthopagri* (Hassan et al. 2015).

O fígado é um importante órgão de armazenamento e sua função primária é a desintoxicação (Olsson et al. 1996) e também é susceptível as variações ambientais, além de ser extremamente sensível aos poluentes aquáticos (Fernandes et al. 2008).

A hipertrofia dos hepatócitos e o deslocamento do núcleo são decorrentes do aumento no número de organelas responsáveis por metabolizar a droga como descrito por Carraschi et al. (2012) em pacus infectados com *A. hydrophila* e tratados com florfenicol; por Kan et al. (2012) em tilápias expostas à deltametrina; por Van Dik et al. (2012) em *Clarias gariepinus* em diferentes ecossistemas aquáticos da África do Sul e por Shiogiri et al. (2012) em pacus expostos ao glyphosate.

A congestão dos capilares sinusóides é consequência do aumento do fluxo sanguíneo para o processo de detoxificação do fígado. A incapacidade de sangue para chegar à veia central faz com que o fígado bombeie o sangue mais forte, resultando em estresse do órgão (Olojo et al. 2005). Essa alteração também foi observada em *Clarias gariepinus* expostos ao chumbo (Olojo et al. 2005); em *C. gariepinus* e em *Leporinus macrocephalus* expostos ao glyphosate (Olurin et al. 2006; Albiati et al. 2009).

O aumento do diâmetro do capilar sinusóide é indicativo de maior fluxo sanguíneo no fígado, sugerindo uma estratégia de eliminação dos catabólitos produzidos por este órgão para posterior excreção renal ou branquial. Esta alteração foi observada por Cengiz e Unlu (2006) em *Gambusia affinis* expostos à deltametrina, por Shiogiri et al. (2012) em pacu expostos ao glyphosate, por Nunes et al. (2014), em *Gambusia holbrooki* expostos à tetraciclina e por Nunes et al. (2015) em *Salmo trutta fario* expostos ao ácido salicílico.

O rim é um bom indicador de metais pesados e pesticidas (Xing et al. 2012) pois é responsável por excretar os metabolitos produzidos pelo fígado. As alterações histopatológicas em tecido de rim são normalmente associadas com a presença de substâncias tóxicas no filtrado dos glomérulos (Silva e Martinez, 2007).

A retração do glomérulo dos peixes expostos ocorre devido à expansão da cápsula glomerular para a eliminação da droga. Essa alteração também ocorreu em *Heteropneustes fossilis* expostos ao clorpirifós (Srivastava et al. 1990) e ao mercúrio (Bano e Hasan, 1990), em *Leporinus macrocephalus* expostos ao glyphosate (Albinati et al. 2009) e em *Carassius auratus* expostos ao chumbo (Khan et al. 2014).

A oclusão e vacuolização dos segmentos proximal ou distal dos túbulos renais podem ocorrer pela acumulação de materiais no lúmen e também como consequência da expansão das células epiteliais (Takashima e Hibiya, 1995). Tal alteração dificulta o fluxo do filtrado e atrasa os processos de reabsorção e secreção no túbulo (Hinton e Lauren, 1990). Essas alterações também foram observadas em *Prochilodus lineatus*, submetidos a testes *in situ* por sete dias em um ribeirão urbano contaminado (Camargo et al. 2007); em *Astyanax altiparanae*

coletados em um ribeirão urbano contaminado (Silva e Martinez, 2007), em *Labeo rohita* expostos ao fenol (Butchiram et al. 2013) e em *Poecilia* sp. cultivadas em esgotos domésticos tratados (Santos et al. 2015).

5. CONCLUSÃO

A presença dos patógenos *Anacanthorus penilabiatus* e *Aeromonas hydrophila* aliados à exposição do IMD e SM causaram alterações em brânquias, fígado e rins de pacus e o período de 14 dias mostrou recuperação inicial de brânquias e rins de *P. mesopotamicus*.

Assim, mais estudos devem ser realizados para a elucidação do período exato de recuperação dos peixes expostos a esses dois fármacos, além de análises cromatográficas para estipular com segurança o período de carência e persistência do IMD e da SM na água e no solo dos tanques e no músculo dos peixes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albinati, A. C., Moreira, E. T., Albinati, R. C., Carvalho, J. V., De Lira, A. D., Santos, G. B., Vidal, L. V., 2009. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piaçu (*Leporinus macrocephalus*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 61(3): 621-627.
- Andrew, J. M., Andrew, E. G., Melissa, J. S., Thomas, M. B., 2001. Experimental infection of an exotic Heterophyid Trematode *Centrocestus formosanus*, in four aquaculture Fishes. North American Journal of Aquaculture. 64(1): 55-59.
- Bano, Y., Hasan, M., 1990. Histopathological lesions in the body organs of cat-fish (*Heteropneustes fossilis*) following mercury intoxication. Journal of Environmental Science and Health Part B. 25(1): 67-85.
- Behmer, A. O., Tolosa, E. M. C., Freitas-Neto, A. G., 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 239p.

Brittain, C., Potts, S. G., 2011. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology*. 12: 321–331.

Brunelli, E., Mauceri, A., Maisano, M., Bernabo, I., Giannetto, A., De Domenico, E., 2011. Ultrastructural and immunohistochemical investigation on the gills of the teleost, *Thalassoma pavo* L., exposed to cadmium. *Acta Histochemistry*. 113: 201–213.

Butchiram, M. S., Kumar, M. V., Tilak, K. S., 2013. Studies on the histopathological changes in selected tissues of fish *Labeo rohita* exposed to phenol. *Journal of Environmental Biology*. 34(2): 247-251.

Carraschi, S. P., da Cruz, C., Neto, J. G. M., Ignacio, N. F., Barbuio, R., Machado, M. R. F., 2012. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 83: 115-120.

Camargo, M. M., Martinez, C. B., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*. 5(3): 327-336.

Cengiz, E., Unlu, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 21: 246–253.

Cepav. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ). Giardacid, 2015. Disponível em <http://www.biocom.com.br/giardacid.htm>

Da Cuna, R. H., Vazquez, G. R., Piol, M. N., Guerrero, N. V., Maggese, M. C., Nostro, F. L. L., 2011. Assessment of the acute toxicity of the organochlorinepesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(4): 1065-1073.

Fanta, E., Rios, F. S. A., Romão, S., Vianna, A. C. C., Freiburger, S., 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54: 119-130.

- Fernandes, C., Fontai'nhas-Fernandes, A., Rocha, E., Salgado, M. A., 2008. Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. *Environmental Monitoring Assessment*. 145 (1–3): 315–322.
- Gernhofer, M., Pawet, M. Schramm, M. Müller, E. Triebkorn, R., 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem, Stress and Recovery*. 8: 241-260.
- Ghelichpour, M., Rajabiesterabadi, H., Hoseini, S. M., 2014. Gill histopathological characteristics of Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) fingerlings treated with potassium permanganate and formalin. *Aquaculture Research*. 47(1): 276 – 282.
- Hassan, M. A., Osman, H. A., Aswathan, M., Al-Shwared, W. A., Fita, N. A., 2015. Infestation of Cage-Cultured Marine Fish with *Benedenia acanthopagri* (Monogenea; Capsalidae) in Eastern Province of Saudi Arabia. *Global Veterinaria*. 14(2): 219-227.
- Heath, A. G., 1995. Water pollution and fish physiology. Lewis Publishers, 2^a ed. 357p.
- Henares, M. N. P., da Cruz, C., Gomes, G. R., Pitelli, R. A., Machado, M. R. F., 2007. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do Diquate na brânquia e no fígado do piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 17: 107-116.
- Henares, M. N. P., da Cruz, C., Gomes, G. R., Pitelli, R. A., Machado, M. R. F., 2008. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 30(1): 77-82.
- Hinton, D. E., Lauren, D. J., 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In *American Fisheries Society Symposium*. 8: 51-66.
- Kan, Y., Cengiz, E. I., Ugurlu, P., Yanar, M., 2012. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral

erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 34(2): 170-179.

Katuli, K., Amiri, B. M., Yelghi, S., 2014. Sublethal effects of organophosphate, diazinon on gill tissue and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fingerling kept in fresh water and brackish water. *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*. 1(1): 37-44.

Kaur, P., Shrivastav, R., 2014. Histological effect of monogenean parasites on gills of freshwater carps. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 2(2): 50-53.

Khan, S. A., Liu, X., Shah, B. R., 2014. Impact of acute toxicity of lead acetate on the level of essential trace metals and histopathological changes in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*. 24(5): 1405-1414.

Mamatha, P., Mohan, M. R., 2013. Impact of nualgi on histopathological alteration in the gills of fish, *Glossogobius giuris* (ham) brought by neem oil. *Pollution Research*. 32(3): 457-465.

Meletti, P. C., Rocha, O., Martinez, C. D. R., 2003. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. *Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*. São Carlos: Rima Editora, p.149-180.

Nogueira, D. J., de Castro, S. C., Vieira, R. C. A., de Sá, O. R., de Azevedo Santos, V.M., 2011. Utilização das brânquias de *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) (Siluriformes; Pimelodidae) como biomarcador de poluição no reservatório da UHE Marechal Mascarenhas de Moraes, Minas Gerais, Brasil. *Biotemas*. 24(3): 51-58.

Nunes, B., Antunes, S. C., Gomes, R., Campos, J. C., Braga, M. R., Ramos, A. S., Correia, A. T., 2014. Acute Effects of Tetracycline Exposure in the Freshwater Fish *Gambusia holbrooki*: Antioxidant Effects, Neurotoxicity and Histological Alterations. *Archives of Environmental Contaminant and Toxicology*. 68(2): 371-381.

Nunes, B., Campos, J. C., Gomes, R., Braga, M. R., Ramos, A. S., Antunes, S. C., Correia, A. T., 2015. Ecotoxicological effects of salicylic acid in the freshwater fish *Salmo trutta fario*: antioxidant mechanisms and histological alterations. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(1): 667-678.

Olojo, E. A. A., Olurin, K. B., Mbaka, G., Oluwemimo, A. D., 2005. Histopathology of the gill and liver tissues of the African catfish *Clarias gariepinus* exposed to lead. African Journal Biotechnology. 4(1): 117-122.

Olurin, K. B., Olojo, E. A. A., Mbaka, G. O., Akindele, A. T., 2006. Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to herbicide, glyphosate. African Journal of Biotechnology. 5(24): 2480-2487.

Olsson, P.E., Larsson, A., Haux, C., 1996. Influence of seasonal changes in water temperature on cadmium inducibility of hepatic and renal metallothionein in rainbow trout. Marine Environmental Research. 42: 41–44

Poleksic, V., Mitrovic-Tutundžic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R., Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish. Fishing News Books, Oxford. p.339-352.

Rabouille, C., Amouroux, D., Anschutz, J., Jouanneaux, J. M., Gilbert, F., Cossa, D., Prevot, F., 2006. Biogeochemical and contaminant cycling in sediments from a human-impacted coastal lagoon – Introduction and summary. Estuarine Coastal Shelf Science. 72: 387-392.

Reimschuessel, R. 2001. A fish model of renal regeneration and development. Ilar Journal. 42: 285-291.

Rocha, T. L., dos Santos, A. P. R., Yamada, Á. T., de Almeida Soares, C. M., Borges, C. L., Bailão, A. M., Sabóia-Morais, S. M. T., 2015. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. Environmental Toxicology Pharmacology. 40(1): 175-186.

Santos, C. A., 2015. A toxicidade dos agrotóxicos usados na lavoura de soja na cidade de catalão-go, e seus impactos no ambiente - Um estudo de caso. Novos Direitos. 1(1): 58-76.

Sensini, C., Della Torre, C., Corsi, I., Focardi, S., 2008. First observations of histopathological effects of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) in gills of European eel *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). Cellular biology and toxicology. 24(6): 621-628.

Sepici-Dinçel, A., Calan, K. B. A., Selvi, M., Sarikaya, R., Sahin, D., Ayhan Ozkul, I., Erkoç, F., 2009. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 72: 1433-1439.

Shiogiri, N. S., Paulino, M. G., Carraschi, S. P., Baraldi, F. G., da Cruz, C., Fernandes, M. N., 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 34(2): 388-396.

Silva, A. G., Martinez, C. B. R., 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23: 185–192.

Santos, E. S., Mota, S., Santos, A. B., Aquino, M. D., 2015. Cultivo do peixe ornamental molinésia (*Poecilia* sp.) em esgotos domésticos tratados: desempenho zootécnico e avaliação do bem-estar animal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 67(1): 255-264.

Srivastava, S.K., Tiwari, P. R., Srivastav A. K., 1990. Effects of chlorpyrifos on the kidney of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Bulletin Environmental Contaminant Toxicology*. 45: 748–751.

Subburaj, A., Francis, T., Elakkanai, P., Jayakumar, N., 2015. Sub-lethal effect of zinc induced histopathological alterations in the gill, liver and kidney of goldfish, (*Carassius auratus*). *Indian Journal Veterinary and Animal Science and Research*, 44(1): 25-35.

Takashima, F., Hibya, T., 1995. An atlas of fish histology: normal and pathological features, 2nd ed. Tokyo, Kodansha. p.283–331.

Tomizawa, M., Latli, B., Casida, J. E., 1999. Structure and Function of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors Studied with Nicotinic Insecticide Affinity Probes. In Yamamoto, I., Casida, J. E., *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, Tokyo: Springer-Verlag, p.271–292.

Tokşen, E., Nemli, E., Değirmenci, U., Karacalar, U., 2013. The effects of azamethiphos and trichlorfon on the control of *Diplectanum aequans* (Monogenea:

Diplectanidae) infestations in cultured broodstock sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Bulletin European Association of Fish Pathology. 33(5): 145.

Van Dyk, J.C., Cochrane, M.J., Wagenaar, G.M., 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus* as a biomarker of aquatic pollution. Chemosphere. 87(4): 301-311.

Venturini, F. P., Moraes, F. D., Cortella, L. R., Rossi, P. A., Cruz, C., Moraes, G., 2015. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fish physiology and biochemistry, 41(1): 299-309.

Virgens, A. C., Castro, R. L., Cruz, Z. M. A., 2015. Alterações histológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenconazol e Sulfluramida. Natureza on line. 13(1): 26-31.

Wood, E. M., 1960. Definitive diagnosis of fish mortalities. Journal (Water Pollution Control Federation). 994-999.

Yoshihara, E., Minho, A. P., Yamamura, M. H., 2013. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados em nematódeos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*). Semina: Ciências Agrárias, 34(6Supl2): 3935-3950.

Xing, H., Shu, L., Zhilei, W., Xuejiao, G., Shiwen, X., Xiaolong, W., 2012. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. Chemosphere. 88: 377–383.

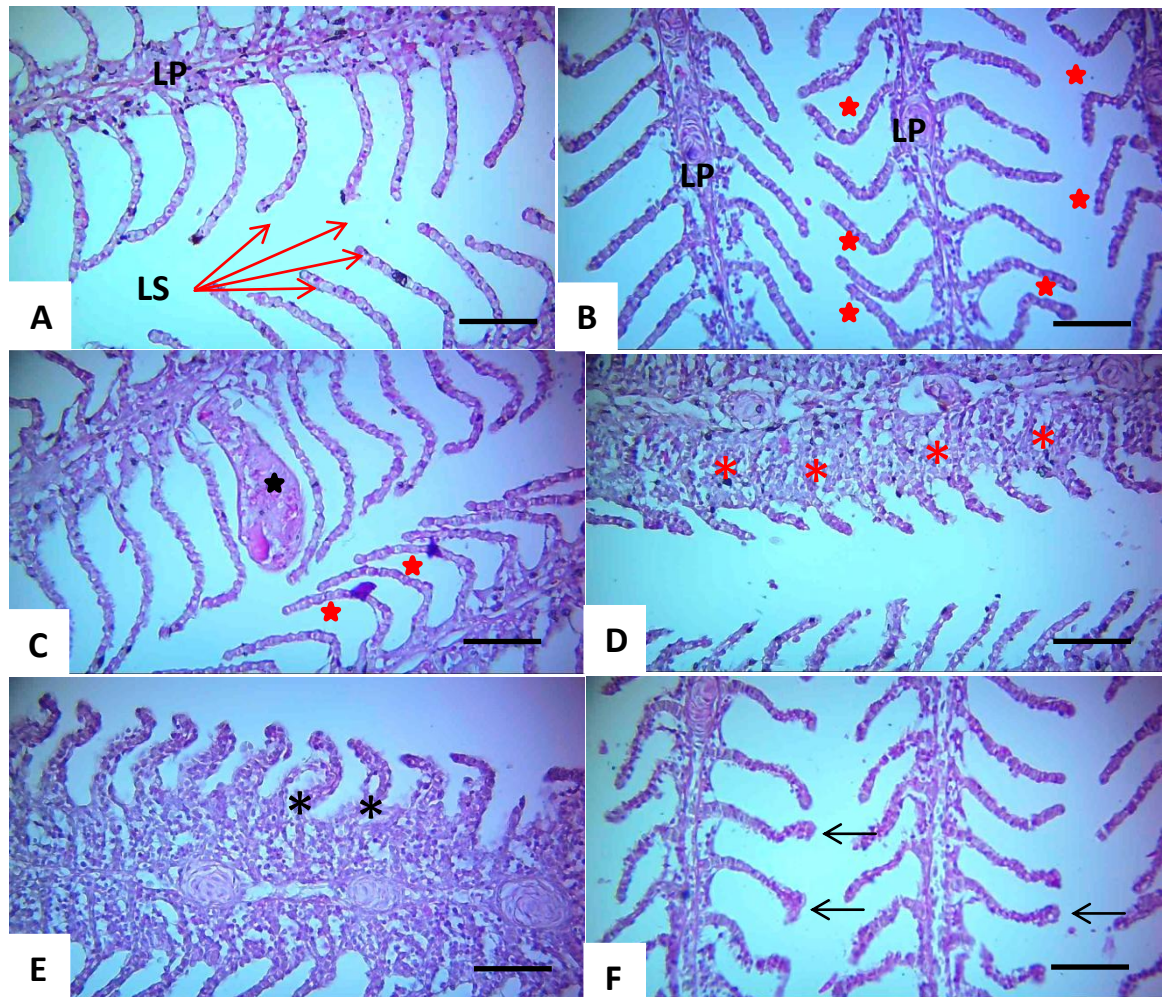


Figura 1. Fotomicrografias de brânquias de pacu. **A.** LP: Lamela primária, LS: Lamela secundária (seta vermelha). **B.** Estrela vermelha: ondulação das lamelas secundárias. **C.** Estrela preta: parasito. **D.** Asterisco vermelho: aumento do epitélio interlamelar. **E.** Asterisco preto: edema. **F.** Seta preta: congestão da lamela secundária. Aumento de 40X, barra de 1,0 cm = 12,5 µm. Coloração Hematoxilina e Eosina.

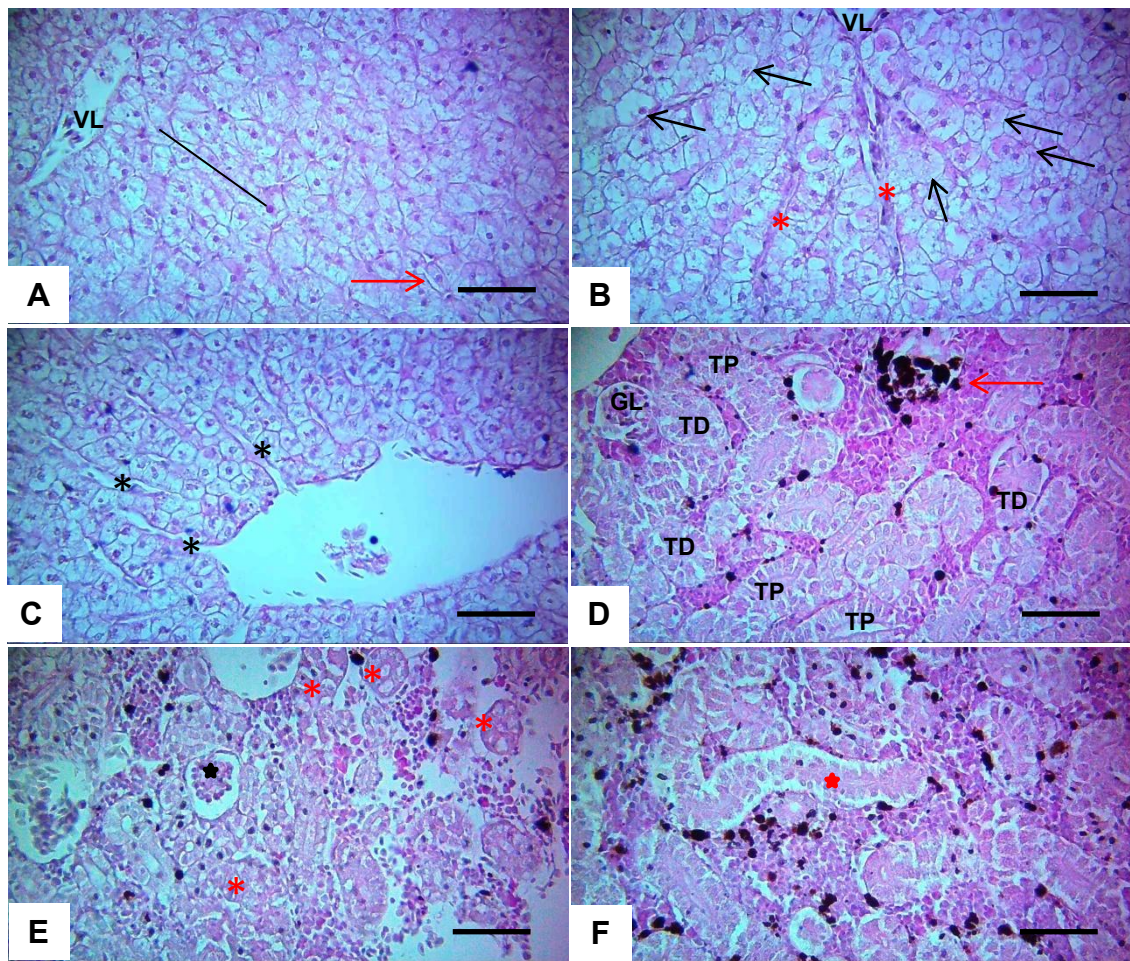


Figura 2. Fotomicrografias de fígado (A, B, C) e rins (D, E, F) de pacu. **A.** VL: Veia Lobular; Seta: Capilar Sinusóide; Linha: Arranjo cordonal dos hepatócitos. **B.** Asterisco vermelho: Congestão dos capilares sinusóides; Seta preta: Hipertrofia dos hepatócitos com núcleo deslocado para a periferia **C.** Asterisco preto: aumento do diâmetro do capilar sinusóide. **D.** Controle TD: Túbulo Distal; TP: Túbulo Proximal; GL: Glomérulo; Seta vermelha: Cento de melanomacrófago **E.** Asterisco vermelho: Vacuolização dos túbulos; Estrela preta: Retração do glomérulo. **F.** Estrela vermelha: oclusão dos túbulos. Aumento de 40X, barra de 1,0 cm = 12,5 µm. Coloração Hematoxilina e Eosina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O inseticida Imidacloprid (IMD) e a associação de antimicrobianos sulfadimetoxina e do metronidazol (SM) possuem potencial para registro na aquicultura brasileira, pois atenderam requisitos importantes como baixa toxicidade para organismos alvo e não-alvos; redução significativa no número de monogenéticos *Anacanthorus penilabiatus* e inibição do crescimento da bactéria *Aeromonas hydrophila* presentes em *Piaractus mesopotamicus*.

No entanto mais estudos são necessários para aumentar a eficácia do IMD; verificar o mecanismo de ação dos fármacos nos patógenos e elucidar o tempo de recuperação dos peixes através das análises hematológicas e histopatológicas, pois o período de 14 dias não foi o suficiente para que os peixes se recuperassem nos dois experimentos. O tempo de persistência do inseticida na água e no solo dos tanques e no músculo dos peixes também de ser verificado para que os fármacos sejam considerados seguros para uso na aquicultura.