

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA AMBIENTAL
E EFICÁCIA BIOLÓGICA DE
ECTOPARASITICIDA EM TAMBACUI
(*Colossoma macropomum*)**

Isabella Alves Brunetti
Bióloga

Jaboticabal, SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA AMBIENTAL
E EFICÁCIA BIOLÓGICA DE
ECTOPARASITICIDA EM TAMBAQUI
(*Colossoma macropomum*)**

Isabella Alves Brunetti

Orientadora: Dr^a. Maria José Tavares Ranzani de Paiva

Coorientador: Dr. Claudinei da Cruz

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

Jaboticabal, SP

2020

B895a

Brunetti, Isabella Alves

Avaliação da segurança ambiental e eficácia biológica de ectoparasiticida em tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Isabella Alves Brunetti. -- Jaboticabal, 2020

65 f. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani de Paiva

Coorientadora: Claudinei da Cruz

1. Toxicologia Modelos animais. 2. Peixe. 3. Inseticidas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA AMBIENTAL E EFICÁCIA BIOLÓGICA DE
ECTOPARASITICIDA EM TAMBQUI (*Colossoma macropomum*)

AUTORA: ISABELLA ALVES BRUNETTI

ORIENTADORA: MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA

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



Profa. Dra. MARIA JOSÉ TAVARES RANZANI DE PAIVA (Participação Virtual)
Instituto de Pesca, IP, São Paulo-SP



Profa. Dra. SILVIA PATRÍCIA CARRASCHI DE OLIVEIRA (Participação Virtual).
Universidade de Araraquara, UNIARA, Araraquara-SP



Profa. Dra. JULIANA HELOISA PINÊ AMÉRICO PINHEIRO (Participação Virtual)
Universidade Brasil, UNIVBRASIL, Fernandópolis-SP

Jaboticabal, 11 de novembro de 2020

prenda a valorizar suas conquistas por menores que sejam para os outros, pois só você sabe mensurar as dificuldades enfrentadas para chegar até aqui. Pois, só quem já lutou muito para alcançar um objetivo sabe quão indescritível é o sentimento de realizar um sonho.

Dedico

Aos meus pais, Luiz Claudio Brandão Brunetti e Rita de Cássia A. B. Brunetti, meu filho Matheus Brunetti Ferreira, amigos e familiares que partilharam desta caminhada comigo.

Agradecimentos

Agradecer a Deus, sempre presente em minha vida, que coloca pessoas no meu caminho pessoas especiais. Aquele que me concede forças para vencer os obstáculos da vida.

Aos meu país, Luiz Claudio e Rita de Cássia, ao meu filho Matheus e minha avó Vanda, que sempre acreditaram no meu sonho de fazer mestrado e não me deixaram desistir, apoiando e ajudando a todo momento sempre, meu muito obrigado e compreensão por tudo. Agradeço a todos familiares e amigos que compartilharam dessa caminhada e apoiaram a cada dificuldade e vitória vencida.

Agradeço a minha orientadora, Prof. Dra^a Maria José Tavares Ranzani de Paiva (Masé) que mesmo estando longe, auxiliando em todas as decisões e resultados e sendo uma mãe me acolhendo em sua casa por uma temporada de experimentos.

Ao Prof. Dr. Claudinei da Cruz, como coorientador, professor, amigo e pai, que desde sempre está ao meu lado ensinando todos os dias, auxiliando, conversando, escutando. Que por anos me ensina a ser uma pessoa melhor e sempre aprender coisas novas que me façam crescer, confiando em mim um pedacinho importante do seu laboratório desde 2014. Agradeço por permitir que todo o projeto fosse realizado dentro do Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia dos Agrotóxicos – LEEA, por toda infraestrutura e suporte dado para que todo melhor fosse feito ao longo desse período. Me faltam palavras para expressar toda gratidão e carinho, obrigada.

Agradeço imensamente a toda equipe do Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia dos Agrotóxicos – LEEA, que sempre me deu amigos incríveis e que topavam trabalhar aos finais de semana fazendo coleta. Sem vocês nada seria possível, Pâmela, Camila, Cecília, Nathália, Wilson, Tales, Karina, Ana Carolina, Henrique, Edivan, Isadora, Cássia e todos que colaboraram com essa caminhada. Claro que em especial, as minhas meninas do peixe, Pâmela, Camila e Cecília, sem essa equipe sensacional não seria possível tantos momentos, congressos, risadas, almoços de “gordices”, choros e fofocas sem a presença de vocês ao meu lado em todo o mestrado.

Agradeço de todo coração a minha amiga Pâmela (Pâm), que é na verdade uma irmã, que cursava até disciplinas nas mesmas datas para passarmos mais tempo juntas. Que em todos os momentos está comigo, rindo, chorando e chorando de ri, nos congressos, viagens de férias, churrasco e na pesquisa, obrigada amiga por todo carinho, confiança e cumplicidade.

Agradeço ao Wilson (Paçoca) que é um amigo mais que especial, me aturando falar sem parar, que fica bravo quando digo que vou desistir e sempre me ajudando a ser pé no chão, que foi mais que especial em todos esses tempos, que com todo seu jeito durão saber me fazer rir e me motivar a continuar.

Agradeço ao Caunesp, que me proporcionou realizar o mestrado, aos docentes por todo ensinamento e conhecimento proporcionado, aos amigos que renderem churrasco, conversa, cervejas e eternas amizades.

Agradeço ao demais envolvidos que contribuíram para que no final tudo desse certo.

Gratidão!

Apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

FAPESP, Bolsa de mestrado, Processo nº2018/1650-1

Sumário

1. Introdução geral.....	1
2. Objetivos	4
3. Referências.....	5
MANUSCRITO 1.....	9
TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO AZAMETIFOS PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS NEOTROPICIAIS	9
Resumo	9
Abstract.....	10
1. Introdução.....	10
2. Material e Métodos.....	13
2.1. Ensaio de toxicidade aguda para as plantas aquáticas.....	13
2.2. Ensaio de toxicidade aguda para o molusco	15
2.3. Ensaio de toxicidade aguda para o <i>D. rerio</i> e <i>C. macropomum</i>	16
2.4. Ensaio de toxicidade crônica para peixe tambaqui (<i>C. macropomum</i>)	17
2.5. Análise histopatológica do tambaqui (<i>C. macropomum</i>)	18
3. Resultados e Discussão	18
3.4. Toxicidade crônica para o organismo alvo tambaqui (<i>C. macropomum</i>).....	20
4. Conclusão	29
5. Referências	30
MANUSCRITO 2.....	36
AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO TAMBAQUI (<i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i>) APÓS TRATAMENTO E RECUPERAÇÃO COM INSETICIDA AZAMETIFÓS	36
1. Introdução.....	38
2. Material e Métodos.....	40
2.1. Simulação de tratamento e recuperação do organismo alvo tambaqui (<i>C. macropomum</i>).....	41
2.2. Análises hematológicas	41
2.3. Análises histopatológicas	42
3. Resultados e Discussão	42
4. Conclusão	51
5. Referências	51

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda (CL50/CE50) do azametifós para as macrófitas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*, para o molusco *Pomacea canaliculata* e para o peixe zebrafish (*Danio rerio*); avaliar a toxicidade aguda e crônica do tambaqui (*Colossoma macropomum*), realizar análises histopatológica em tambaqui após exposição crônica e histopatológicas e hematológicas após ensaio de simulação de tratamento e recuperação. Ensaio de toxicidade aguda foram realizados com *Azolla caroliniana*, *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata*, *Danio rerio* e *Colossoma macropomum* todos de acordo com as normas da ABNT e OECD. Para os ensaios de toxicidade crônica os peixes foram expostos às concentrações subletais dos inseticidas por sete dias, e coletadas amostras de órgãos (brânquia, fígado, cérebro e rim) para avaliação histológica. Para o ensaio de simulação de tratamento, os peixes foram expostos ao azametifós por sete dias e após seguiram 21 dias de recuperação e nos dois tempos foram avaliadas as variáveis hematológicas e as alterações histopatológicas do tambaqui (*C. macropomum*). O azametifós é pouco tóxico para *A. caroliniana*, moderadamente tóxico para *L. minor*, *C. macropomum* e muito tóxico para o *P. canaliculata* e *D. rerio*. A exposição subletal crônica de tambaqui ao inseticida revelou alterações histológicas em brânquia e fígado. Após sete dias de simulação de tratamento, os peixes apresentaram aumento de leucócitos totais, monócitos, linfócitos e neutrófilos. Após 21 dias de recuperação os peixes apresentaram aumento de VCM, HCM e CHCM em relação aos 7 dias de tratamento. Na análise histopatológica (brânquia, cérebro, fígado e rim) ao final de 7 dias de tratamento todas as amostras apresentaram alterações em relação ao controle. Após os 21 dias de recuperação, as análises histológicas demonstraram que o tecido nervoso e hepático apresentou 100% de recuperação das células em todas as concentrações testadas. Nas brânquias, apenas nas concentrações 0,042 e 0,21 mg L⁻¹ ocorreu recuperação das lamelas branquiais e as alterações do tecido renal não foram recuperadas. Assim, a presença de azametifós em ambientes aquáticos pode comprometer a sobrevivência de organismos não alvos e prejudicar o funcionamento dos órgãos dos peixes expostos. A simulação de tratamento e recuperação com o azametifós demonstrou alterações histopatológicas e não causa alterações hematológicas significativas no tambaqui, com recuperação dos tecidos branquiais, nervoso, hepático e do sangue, em baixas concentrações.

Palavras-chaves: Ecotoxicologia; histologia; hematologia; bioindicadores.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the acute toxicity (LC50 / EC50) of azametiphos for the macrophytes *Lemna minor* and *Azolla caroliniana*, for the mollusk *Pomacea canaliculata* and for the zebrafish fish (*Danio rerio*); evaluate the acute and chronic toxicity of tambaqui (*Colossoma macropomum*), perform histopathological analysis in tambaqui after chronic exposure and histopathological and hematological tests after treatment simulation and recovery. Acute toxicity tests were performed with *Azolla caroliniana*, *Lemna minor*, *Pomacea canaliculata*, *Danio rerio* and *Colossoma macropomum* all in accordance with ABNT and OECD standards. For chronic toxicity tests, fish were exposed to sublethal concentrations of insecticides for seven days, and organ samples (gills, liver, brain and kidney) were collected for histological evaluation. For the treatment simulation test, the fish were exposed to azametiphos for seven days and after 21 days of recovery, at both times, hematological variables and histopathological changes in the environment (*C. macropomum*) were evaluated. Azametiphos is slightly toxic to *A. caroliniana*, moderately toxic to *L. minor*, *C. macropomum* and very toxic to *P. canaliculata* and *D. rerio*. The chronic sublethal exposure of tambaqui to the insecticide revealed histological changes in gills and liver. After seven days of treatment simulation, the fish showed an increase in total leukocytes, monocytes, lymphocytes and neutrophils. After 21 days of recovery, the fish showed an increase in VCM, HCM and CHCM in relation to the 7 days of treatment. In the histopathological analysis (gill, brain, liver and kidney) at the end of 7 days of treatment, all samples showed changes in relation to the control. After 21 days of recovery, histological analysis showed that the nervous and hepatic tissue showed 100% recovery of cells in all concentrations tested. In the gills, only in the concentrations 0.042 and 0.21 mg L⁻¹ did the gill lamellae recover and the changes in the renal tissue were not recovered. Thus, the presence of azametiphos in aquatic environments can compromise the survival of non-target organisms and impair the functioning of exposed fish organs. The simulation of treatment and recovery with azametiphos demonstrated histopathological changes and does not cause significant hematological changes in tambaqui, with recovery of branchial, nervous, hepatic and blood tissues, in low concentrations.

Keywords: Ecotoxicology; histology; hematology; bioindicators.

1. Introdução geral

A aquicultura é considerada uma atividade de criação/cultivo de organismos aquáticos, incluindo plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes, sendo que a intervenção ou manejo do processo de criação é imprescindível para o aumento da produção (Oliveira, 2015). Dentre os países produtores, o Brasil tem papel de destaque, em especial por sua disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de espécies aquáticas de interesse zootécnico e mercadológico (Brasil, 2013).

Dentre os problemas que ocorrem durante o ciclo produtivo de peixes, os ecto e endoparasitos são considerados os principais causadores de perdas econômicas, devido a mortalidade de peixes em diferentes fases, especialmente na larvicultura, alevinagem e nas fases iniciais de engorda. A ocorrência destes patógenos na aquicultura mundial sofre influência de diversos fatores ambientais, manejo, estrutura da comunidade e patogenicidade dos parasitos (Kuhn et al., 2016; González et al., 2018). Outro ponto importante é o surgimento de novos patógenos introduzidos por espécies exóticas e o desenvolvimento de resistência, além da intensificação dos sistemas de produção (Carraschi et al., 2015).

A maioria das doenças em peixes pode ser diagnosticada pela avaliação da qualidade da água e pelo exame raspado de pele com microscopia de luz (Noga, 2010), arranhões na pele, cliques de aletas e biópsia de brânquias devem ser considerados o banco de dados de diagnóstico mínimo para a maioria das espécies de peixe. Estes diagnósticos podem ajudar a identificar parasitos ou granulomas externos, embolia gasosa, organismos fúngicos, algumas bactérias e fornecer um diagnóstico presuntivo para algumas doenças virais (Erlacher-Reid, 2018). A maioria das doenças dos peixes é secundária e provém de uma qualidade de água e criação imprópria. Portanto, a saúde animal deve ser mantida, garantindo filtração, substrato, densidade de estocagem, qualidade da água e nutrição apropriadas (Erlacher-Reid, 2018).

O maior problema na utilização de fármacos na criação de peixes são os possíveis efeitos sobre os organismos aquáticos não alvos. Para Adams et al. (1989) e Connon et al. (2012) efeitos da contaminação podem comprometer a aptidão ecológica de organismos ou populações, sendo possível mensurar a toxicidade aguda, a mortalidade e sinais de intoxicação, a toxicidade subletal, ou crônica, expressos em

diversos níveis de organização biológica (por exemplo, molecular, bioquímico, fisiológico, histológico, reprodutivo) que a longo prazo podem resultar em impactos severos à comunidade.

O emprego de organismos bioindicadores vem crescendo na ecotoxicologia. Estes organismos representam uma alternativa econômica para a estimativa da toxicidade ambiental em doses subletais por meio de ensaios biológicos (Farré e Barceló, 2003), apresentando potencial para mensurar a exposição de diferentes compostos (Brooks et al., 2006). Os bioindicadores podem ser terrestres ou aquáticos, tais como: plantas terrestres (Inoue, 2012; Boutin et al., 2012); minhoca (Chen et al., 2014), caramujos de água doce como *Pomacea canaliculata* (Venturini et al., 2008; Florêncio et al., 2014; Moreira et al., 2014), plantas aquáticas, como a *Azolla caroliniana* (Guimaraes et al., 2012; Silva et al., 2012) e peixes neotropicais (Cruz et al., 2008; Botelho et al., 2009; Silva et al., 2014), dentre outros.

No Brasil, a aquicultura se expandiu nos últimos anos, sendo alvo de muitos estudos sobre práticas de manejo. Vários prejuízos econômicos a esta atividade foram relatados devido às práticas de manejo inadequadas, alta densidade populacional, o não-controle da qualidade da água, o que deixa os animais vulneráveis às enfermidades (Mabilia e Souza, 2006).

Apesar de existirem tratamentos para combater possíveis enfermidades com o uso de inseticidas, no Brasil ainda não existe um órgão governamental que fiscalize o uso destes químicos na aquicultura (Campos, 2005). Devido a não recomendação dos inseticidas para o setor aquícola, o uso na piscicultura de produtos não registrados para este fim leva a aplicações de doses exageradas no combate às doenças. Poucos são os estudos realizados para avaliar a toxicidade dos inseticidas para os animais alvos e não alvos (Abe, 2012).

O uso frequente e inadequado de determinado inseticida, tanto na agricultura, aquicultura, ou combate a vetores de doenças, pode acarretar resistência dos organismos a tais substâncias químicas (Paiva, 2006). A resistência aos inseticidas compromete diretamente a eficácia do controle químico.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um peixe de água doce pertencente à família Serrasalminidae, com ocorrência natural nas bacias do Amazonas e do Orinoco (Jégu, 2003). O alimento natural do tambaqui, é composto principalmente de frutas e

sementes (Lucas, 2008). A produção aquícola de tambaqui aumentou nos últimos 10 anos em vários países da América do Sul, particularmente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (Valladão et al., 2016).

O tambaqui é considerado o peixe nativo mais importante produzido na aquicultura brasileira, com aproximadamente 101 mil toneladas em 2019 (IBGE, 2019). A produção de tambaqui tem se adaptado em todo o Brasil, particularmente nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do país.

Dentre os fármacos com potencial para ser utilizado como ectoparasiticida está o organofosforado azametifós considerado moderadamente tóxico e utilizado como inseticida, não bioacumulativo, altamente solúvel em água, volátil e não deve lixiviar para as águas subterrâneas. É um produto químico neurotóxico e inibidor da acetil colinesterase. O azametifós é altamente tóxico para aves e invertebrados aquáticos e moderadamente tóxico para peixes, segundo o Pesticide Properties DataBase (2018). O azametifós é altamente eficaz (85% ou melhor) contra piolhos de salmão (*Salmo salar*) e pré-adultos (*Lepeophtheirus salmonis*) e é o fármaco mais utilizado para controle de *Caligus rogercresseyi* na salmonicultura do Chile (Roth et al., 1995).

A utilização destes inseticidas aumenta os impactos ambientais, uma vez que estes são lixiviados e/ou carreados com a chuva até os recursos hídricos. A contaminação destes locais frequentemente é observada por meio da mortalidade do sistema biótico, entretanto, outros sinais como alterações genéticas, histológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais podem ocorrer nos organismos não alvos.

As variáveis hematológicas são ferramentas sensíveis para o diagnóstico de doenças e monitoramentos do status fisiológico de peixes expostos a agentes tóxicos (Zhang et al., 2007). Os parâmetros hematológicos podem disponibilizar informações satisfatórias acerca das respostas fisiológicas dos peixes frente aos estressores ambientais por duas razões principais: a associação entre o ambiente externo e o sistema circulatório dos peixes e a disponibilidade de acessar o sangue dos peixes (Elahee e Bhagwant, 2007).

As alterações histológicas e morfológicas são observadas em diversos organismos afetados por contaminantes. As brânquias de peixes, por exemplo, são altamente sensíveis a materiais irritantes presentes na água (Wester e Roghair, 1994).

Assim, na produção aquícola brasileira é comum a utilização de produtos químicos sem registro, de outras áreas da produção agropecuária de forma indiscriminada em todas as fases da produção. Esta prática tem causado vários impactos diretos e indiretos na qualidade do peixe produzido. O desenvolvimento de novas moléculas com perfil adequado a piscicultura brasileira é o ponto principal no desenvolvimento e na qualidade dos processos de tratamento de doenças, garantindo ausência de efeitos subletais, morfofuncionais e genéticos nos peixes alvos do tratamento, baixa toxicidade ambiental para organismos não alvos dos tratamentos, aumentando a saúde ambiental e melhor qualidade do produto final para o consumidor.

Baseado nas premissas de boas práticas de manejo, o desenvolvimento e prospecção de novas moléculas para o tratamento de doenças é fundamental no processo de tomada de decisão sobre o desenvolvimento da piscicultura brasileira. O azametifós apresenta histórico favorável à sua caracterização e utilização, pois possui registro específico para aquicultura em outros países, porém é necessário a sua avaliação em condições e para modelos biológicos nativos, perfil ecotoxicológico dos possíveis efeitos crônicos nos tecidos dos peixes, efeitos durante o tratamento e a recuperação dos animais.

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- i) Avaliar a toxicidade aguda (CL50/CE50) do azametifós para as macrófitas não alvos lentilha d'água (*Lemna minor*) e samambaia d'água (*Azolla caroliniana*), para o caramujo (*Pomacea canaliculata*) e o peixe zebrafish (*Danio rerio*).
- ii) Avaliar a toxicidade aguda e crônica do azametifós para o tambaqui (*Colossoma macropomum*).
- iii) Análisar a histopatológica de brânquia, cérebro, fígado e rim após o ensaio de toxicidade crônica do azametifós para o tambaqui (*C. macropomum*).
- iv) Simular o tratamento com azametifos e recuperação do tambaqui (*C. macropomum*) e análises histopatológicas e hematológica.

3. Referências

- Abe, F. R. Avaliação ecotoxicológica e risco ambiental dos inseticidas utilizados no controle da larva de *Aedes aegypti* para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e peixes. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, SP, 2012.
- Adams, S. M., Shepard, K. L., Greeley Jr, M. S., Jimenez, B. D., Ryon, M. G., Shugart, L. R., McCarthy, J. F., Hinton, D. E. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research*, v. 28, n. 1, p. 459-464, 1989.
- Botelho, R.G. Santos, J.B. Oliveira, T.A. Braga, R.R. Byrro, E.C.M. Toxicidade aguda de herbicidas a tilápia (*Oreochromis niloticus*). *PlantaDaninha*, v.27, n.3, p.621-626, 2009.
- Boutin, C. Aya, K.L. Carpenter, D. Thomas, P.J. Rowland, O. Phytotoxicity testing for herbicide regulation: Shortcomings in relation to biodiversity and ecosystem services in agrarian systems. *Science of the Total Environment*, v.415, p.79–92, 2012.
- Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011. Brasília: República Federativa do Brasil. 2013.
- Brooks, B.W. Riley, T. Taylor, R.D. Water quality of effluent dominated stream ecosystems: ecotoxicological, hydrological, and management considerations. *Hydrobiologia*, v.556, p.365-379, 2006.
- Campos, J. L. A falta de produtos registrados para uso em aquicultura no Brasil – Uma brecha para a imposição de barreiras comerciais e risco para os consumidores. *Panorama da Aquicultura*, Jan./Fev. 2005.
- Carraschi, S.P.; Florencio, T.; Garlich, N.; Silva, A.F.; Marques, A.M.; Cruz, C.; Paiva, M.J.T.R. Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, v. 7, n. 3, p. 3136, 2015.
- Chen, C. Wang, Y. Zhao, X. Qian, Y. Wang, Q. Combined toxicity of butachlor, atrazine and k-cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method. *Chemosphere*, v.112, p.393–401, 2014.
- Connon Re, Geist J, Werner I. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors*, v. 12, p. 12741–71, sep. 2012.

Cruz, C. Cubo, P. Gomes, G.R. Venturini, F.P. Guilherme, P.E. Pitelli, R.A. Sensibilidade de peixes neotropicais ao dicromato de potássio. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v.3, n.1, p.53-55, 2008.

Elahee, K.B., Bhagwant, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical species from a polluted lagoon on the West coast of Mauritius. Ecotox. Environ. Saf. n. 68, p. 361-371, 2007.

Erlacher-Reid, Claire D. Considerations for Treatment of Large Zoologic Collections: Fish. Vet Clin Exot Anim, v. 21, p. 311–325, 2018.

Farré, M. & Barceló, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. Trends Anal. Chem. v.22, n.5, p. 299-310, 2003.

Florencio, T. Carraschi, S.P. Cruz, C. Silva, A.F. Marques, A.M. Pitelli. R.A. Bioindicadores neotropicais de ecotoxicidade e risco ambiental de fármacos de interesse para a agricultura. Bol. Inst. Pesca. v.40. n.4. p. 569-576. 2014.

González. A.F. Gracia, J. Miniño, I. Romón, J. Larsson, C. Maroto, J. Regueira, M. Pascual, S. Approach to reduce the zoonotic parasite load in fish stocks: When science meets technology. Fisheries Research., v. 202, p. 140-148, 2018.

Guimaraes, F.P.; Aguiar, R.; Oliveira, J.A.; Silva, J.A.A.; Karam, D. Potential macrophytes for removing arsenic from aqueous solution. Planta Daninha, v.30, n.4, p.683-696, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal 2019. Rio de Janeiro, v.41, p. 1–108, 2019.

Inoue, M.H. Seleção de bioindicadores para herbicidas residuais aplicados em pré-emergência. Revista de Ciências Agro-Ambientais, v.10, n.2, p.173-182. 2012.

Jégu, M. “Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas),” in Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, eds R. E. REIS, S. O. KULLANDER, AND C. J. FERRARIS (Porto Alegre: Edipucrs), p. 182–196, 2003.

Kuhn, T. Cunze, S. Kochmann, J. Klimpel, S. Environmental variables and definitive host distribution: a habitat suitability modelling for end helminth parasites in the marine realm. Nat. Sci. Rep. 6, 30246, 2016.

Lucas, C. M. Within flood season variation in fruit consumption and seed dispersal by two characin fishes of the Amazon. Biotropica, v. 40, p. 581–589, 2008.

Mabilia, R. G.; Souza, S. M. G. Efeito do tratamento com Diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea*

cyprinacea (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 28, n. 2, p. 159-163, 2006.

Moreira, R.A. Mansano, A.S. Silva, L.C. Rocha, O. A comparative study of acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v.26, n.1, p.1-8, 2014.

Noga, E. J. Fish disease: diagnosis and treatment. 2nd edition. Ames (IA):: Wiley Blackwell; 2010.

Oliveira, R. C. O panorama da aquicultura no brasil. *Revista Intertox de toxicologia risco ambiental e sociedade*. Maio, 2015. DOI: [10.22280/revintervol2ed1.18](https://doi.org/10.22280/revintervol2ed1.18)

Paiva, M. H. S. Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvido na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil. Dissertação (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães), 72p, 2006.

PPDB: Pesticide Properties Data Base. Janeiro de 2018. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/48.htm>. Acesso em: 22/03/2018

Roth, M.; Richards, R. H.; Dobson, D. P.; Rae, G. H. Field trials on the efficacy of the organophosphorus compound azamethiphos for the control of sea lice (*Copepoda: Caligidae*) infestations of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, v.140, p. 217-239, 1996.

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

Silva, A.F. Cruz. C. Rezende, F.R.L. Yamuichi, A.K.F. Pitelli, R.A. Copper sulfate acute ecotoxicity and environmental risk for tropical fish. *Acta Scientiarum*. v.36. n.4. p.377-381, 2014.

Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pádua, S.B., Martins, M.L., Pilarski, F. *Trichodina heterodontata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study. *Parasitology*, v. 141, n. 05, p. 662–669, 2014.Ji

Venturini, F.P. Cruz, C. Pitelli, R.A. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*). *Acta Sci. Biol. Sci.*, v.30. n.2, p.179-184, 2008.

Wester, P.W.; Roghair, C.J. Monitoring of sublethal chronic effects in fish: the pathomorphological approach. In: MULLER, R; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fishes. United Nations, Fishing News Books, p. 339-352. 1994.

Zhang, X. Xie, P. Li, D. Shi, Z. Hematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms of anemia. *Toxicon*. n. 49, p. 1150-1157, 2007.

MANUSCRITO 1

TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO AZAMETIFOS PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS NEOTROPICIAIS

**Isabella Alves Brunetti^{1*}, Camila Aparecida Faleiros², Pâmela Castro Pereira³,
Cecilia Alves de Pádua², Wilson Roberto Cerveira Junior³, Claudinei da Cruz²,
Maria José Tavares Ranzani de Paiva¹**

¹ Centro de Aquicultura da Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/n, Zonal Rural, Jaboticabal (SP), Brasil. Cep: 14884-900.

*E-mail: isabella.abrunetti@hotmail.com

² Centro Universitário da fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, departamento LEEA – Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia dos Agrotóxicos.

³ Unesp FCVA – Produção Vegetal, campus Jaboticabal-SP.

Resumo

O maior problema na utilização de fármacos na criação de peixes são os possíveis efeitos sobre os organismos aquáticos não alvos. Assim, o emprego de organismos bioindicadores de exposição representam alternativa econômica para a estimativa da toxicidade ambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda (CL50/CE50) do azametifós para as macrófitas *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*, para o molusco *Pomacea canaliculata* e para o zebrafish (*Danio rerio*); avaliar a toxicidade aguda e crônica do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e realizar análises histopatológica após o ensaio de toxicidade crônica do tambaqui. Ensaio de toxicidade aguda foram realizados com *A. caroliniana*, *L. minor*, *P. canaliculata*, *D. rerio* e *C. macropomum* de acordo com as normas da ABNT e OECD. Para os ensaios de toxicidade crônica os peixes foram expostos às concentrações subletais dos inseticidas por sete dias, e coletadas amostras de órgãos (brânquia, fígado, cérebro e rim) para avaliação histológica. O azametifós é pouco tóxico para *Azolla caroliniana* (CL50: 13,39), moderadamente tóxico para *L. minor* (CL50: 6,53), *C. macropomum* (CL50: 1,40) e muito tóxico para o *P. canaliculata* (CE50: 0,45) e *D. rerio* (CL50: 0,52). A exposição subletal de tambaqui ao inseticida causou alterações histológicas em brânquia, cérebro, fígado e rim. A presença de azametifós em ambientes aquáticos pode comprometer a sobrevivência de organismos não alvos e prejudicar o funcionamento dos órgãos dos peixes expostos.

Palavras chaves: Ecotoxicologia; plantas aquáticas, peixes; organofosforado.

Abstract

The biggest problem in the use of drugs in fish farming is the possible effects on non-target aquatic organisms. Thus, the use of exposure bioindicator organisms represents an economical alternative for estimating environmental toxicity. The aim of this study was to evaluate the acute toxicity (LC50 / EC50) of azametiphos for the macrophytes *Lemna minor* and *Azolla caroliniana*, for the mollusk *Pomacea canaliculata* and for the zebrafish (*Danio rerio*); evaluate the acute and chronic toxicity of tambaqui (*Colossoma macropomum*) and perform histopathological analysis after the chronic toxicity test of tambaqui. Acute toxicity tests were performed with *A. caroliniana*, *L. minor*, *P. canaliculata*, *D. rerio* and *C. macropomum* in accordance with ABNT and OECD standards. For chronic toxicity tests, fish were exposed to sublethal concentrations of insecticides for seven days, and organ samples (gills, liver, brain and kidney) were collected for histological evaluation. Azametiphos is slightly toxic to *A. caroliniana* (CL50: 13.39), moderately toxic to *L. minor* (CL50: 6.53), *C. macropomum* (CL50: 1.40) and very toxic to *P. canaliculata* (EC50: 0.45) and *D. rerio* (LC50: 0.52). The sublethal exposure of tambaqui to the insecticide caused histological changes in gills, brain, liver and kidney. The presence of azametiphos in aquatic environments can compromise the survival of non-target organisms and impair the functioning of exposed fish organs.

Keyword: Ecotoxicology; aquatic plants, fish; organophosphate.

1. Introdução

A utilização de fármacos na aquicultura tem se tornado uma prática comum a cada ciclo de produção, especialmente devido a ocorrência de novos patógenos introduzidos por espécies exóticas, do desenvolvimento de resistência e da intensificação dos sistemas de produção (Carraschi et al., 2016). Em aquicultura intensiva há muitas opções de controle de doenças, incluindo ração medicamentosa contendo antimicrobianos e antiparasitários, banhos químicos, vacinas, métodos mecânicos (tais como mudanças temporárias na temperatura ou salinidade da água para

combater parasitas externos) e práticas eficazes de biossegurança e manejo (Noga, 2011; Love et al., 2020).

Os fármacos utilizados para controle do piolho de salmão (*Lepeophtheirus salmonis*) (Langford et al., 2014; Samuelsen et al., 2015) foram fundamentais para o estabelecimento da sua cadeia produtiva, especialmente o uso de azametifos e deltametrina (Johannessen, 2017; Grefsrud et al., 2018). Um exemplo de intensificação é produção mundial de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) que se expandiu rapidamente nos últimos anos, porém o principal problema encontrado na criação de salmão é a presença de ectoparasitas copépodes pertencentes aos gêneros *Lepeophtheirus* e *Caligus* (Caligidae: Crustacea) (Rae, 2002).

Contudo, o uso de fármacos pode trazer impactos negativos aos sistemas aquáticos onde estão inseridos os sistemas de produção. Assim, é necessário a avaliação de toxicidade e os efeitos tóxicos das substâncias químicas para a biota aquática (Magalhães; Filho, 2008). Para Jardim (2004) os testes toxicidade são ferramentas para o estudo dos efeitos dos agentes tóxicos sobre organismos aquáticos e está fundamentado no princípio de que a resposta dos organismos vivos depende da dose do tóxico a que foram submetidos.

Os dados ecotoxicológicos são base para se estabelecer quantidades limites seguras dos contaminantes químicos no ambiente e para a avaliação de risco ambiental. Os testes ecotoxicológicos iniciam-se com a toxicidade aguda, estabelecida com a determinação da concentração efetiva média (CE50) - concentração que provoca imobilidade/mortalidade em metade dos organismos-testes. Nestes testes avalia-se uma resposta rápida e severa dos organismos aquáticos ao estímulo que se manifesta, geralmente em períodos entre 24 a 96 horas (Rand e Petrocelli, 1985).

Nos estudos de toxicidade crônica avalia-se a ação das substâncias químicas por meio da resposta a um estímulo por longo período, geralmente de 1/10 do ciclo vital até a totalidade da vida do organismo. Esses efeitos são subletais, onde as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, porém afetam suas funções biológicas, como a reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e comportamento (Rand e Petrocelli, 1985).

Para a escolha de um bioindicador ideal, deve ser observada uma série de características, tais como a plasticidade do animal ou planta a sobreviver a um ambiente considerado saudável, mas também suportar o ambiente exposto ao contaminante alvo,

abundância do organismo e facilidade no manuseio em laboratório (Lins et al., 2017). Diante deste fato, os peixes apresentam características favoráveis como bioindicadores, pois apresentam um número elevado de indivíduos, importância ecológica e possuem um alto nível de estratégias comportamentais e reprodutivas, assim como o fato de serem muito sensíveis a variações do meio (Fávaro; Oliveira, 2012; Rand, 2008).

A planta aquática *Azolla caroliniana* é uma planta flutuante que não está estabelecida como bioindicador nas normas de ensaios ecotoxicológicos, mas apresenta facilidade de manejo, curto ciclo de vida, é de pequeno porte (Bennicelli et al., 2004; Guimarães et al., 2006; Silva et al., 2012), e tem demonstrado sensibilidade a diversos produtos químicos como herbicidas, fungicidas e inseticidas (Della Vechia et al., 2016; Sanford et al., 2020), dentre outros. A *Lemna minor* é bioindicador obrigatório em processos de registros de produtos químicos e tem sido utilizada em uma ampla variedade de pesquisas de ecotoxicologia, com fontes de cobre, herbicida diquat (Garlich et al., 2016), metais pesados (Rezania et al., 2016) e produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) (Ebele et al., 2017).

O caramujo de água doce *Pomacea canaliculata* não é obrigatório em norma de ensaio ecotoxicológico, porém é um bom bioindicador, sensível aos xenobióticos (Venturini et al., 2008; Xu et al., 2017). O zebrafish (*D. rerio*) é peixe um modelo em ecotoxicologia, de pequeno porte, fácil reprodução e manejo (Hill et al., 2005).

O tambaqui (*C. macropomum*), como bioindicador da qualidade ambiental têm sido relatados em diversos trabalhos como Affonso et al. (2002), Ferreira da Costa et al. (2004), Matsuo et al. (2005), Assis et al. (2007, 2010), Duarte et al. (2010), Rico et al. (2011), Salazar-Lugo et al. (2009, 2011), na avaliação da espécie aos efeitos de potenciais poluentes. Essa espécie é encontrada em águas com temperatura entre 25 °C e 34 °C (Dairiki; Silva, 2011), habita lagoas abertas, muitas vezes sujeito a condições temporárias de hipóxia (ou até a anóxia), entretanto é considerada uma espécie tolerante a hipóxia (~ 1 mg/L) (Affonso et al., 2002; Sundin et al., 2000; Dairiki; Silva, 2011), são tolerantes a variações de pH entre 4,0 e 8,0, demonstrando ausência de perturbação do equilíbrio iônico (Marcon Filho, 1999).

No ambiente natural, o tambaqui é classificado como frugívoro exclusivo, quando adulto, e onívoro com tendência zooplanktonofágo, na fase jovem (Saint-Paul, 1984). Na Amazônia, o tambaqui, *C. macropomum*, vem sendo utilizado como organismo bioindicador (Brust e Pintos, 2005; Araujo et al., 2005; Oliveira et al., 2005).

Devido a falta de fármacos com registros para aquicultura, mas a necessidade de utilização para conter os patógenos, a utilização indiscriminada tem causado vários impactos diretos e indiretos na qualidade do peixe produzido. O desenvolvimento de novas moléculas com perfil adequado para a piscicultura brasileira é o ponto principal no desenvolvimento e na qualidade dos processos de tratamento de doenças, garantindo ausência de efeitos subletais, morfofuncionais e genéticos nos peixes alvos do tratamento, baixa toxicidade ambiental para organismos não alvos dos tratamentos, aumentando a saúde ambiental e melhor qualidade do produto para o consumidor.

Baseado nas premissas de boas práticas de manejo, o desenvolvimento e prospecção de novas moléculas é fundamental no processo de tomada de decisão sobre o bom andamento da piscicultura brasileira. O azametifós apresenta histórico favorável à sua caracterização, pois possui registro específico em outros países, porém é necessário a avaliação em condições e para modelos biológicos brasileiros. Assim a sua caracterização é de fundamental importância para o conhecimento do seu perfil ecotoxicológico para utilização nos peixes nativos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar toxicidade aguda (CL50; CE50) do azametifós para as macrófitas não alvos, *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*, para o molusco *Pomacea canaliculata* e o zebrafish (*Danio rerio*). Avaliar a toxicidade aguda e crônica do azametifós para o tambaqui (*C. macropomum*) e análise histopatológica do ensaio de toxicidade crônica do azametifós para o tambaqui.

2. Material e Métodos

Para realização dos ensaios de toxicidade foi utilizado o ingrediente ativo azametifós $C_{19}H_{10}ClN_2O_5P_5$, CAS. 35575-96-3, que pertence ao grupo químico dos organofosforados da classe dos inseticidas, com classificação toxicológica III – moderadamente tóxico. O produto é solúvel em água e sua composição é de: Azametifós 1,0 % p/p + atrativos e veículo (inertes).

O projeto passou por aprovação na Comissão de ética no uso de animais – CEUA no Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, protocolo nº 06_2019.

2.1. Ensaio de toxicidade aguda para as plantas aquáticas

As plantas *L. minor* e *A. caroliniana* foram cultivadas em caixas de 200,0 L contendo substrato orgânico, latossolo, areia (1:1:1; v v⁻¹), com fotoperíodo natural. Após seu crescimento estas foram transferidas para cristalizadores contendo meio de cultivo Hoagland's em sala de bioensaio com temperatura 25,0 ± 2,0 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, por quatro dias (OECD, 2002).

Para avaliação da sanidade do lote das plantas *L. minor* foi realizado um ensaio de toxicidade aguda (CL50;7d), sistema estático, com a substância referência cloreto de sódio (NaCl) com as concentrações: 0,01; 0,10; 0,50; 1,00; 2,00 e 4,00 g L⁻¹ e o controle, com duração de sete dias. E para as plantas *A. caroliniana*, foi realizado um ensaio de toxicidade aguda (CL50;7d), estático, com a substância referência cloreto de sódio (NaCl) com as concentrações: 0,01; 0,09; 0,80; 1,40; 2,45 e 7,50 g L⁻¹ e o controle, com duração de sete dias.

Para *L. minor* para a substância referência cloreto de sódio (NaCl) a concentração letal 50% (CL50;7d) foi de 1,0 g L⁻¹ sem determinação de intervalo de confiança. Para a *A. caroliniana* a sensibilidade ao cloreto de sódio a (CL50;7d) foi de 1,29 g L⁻¹ com intervalo de confiança de 95% entre 1,08 e 1,56 g L⁻¹. A equação linear que representa a relação concentração-mortalidade e coeficiente de determinação de ambas as plantas estão representados na tabela 01.

Nos ensaios de toxicidade aguda do azametifós para as plantas aquáticas foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,10; 1,07; 3,44; 11,16; 36,40; e 118,0 mg L⁻¹ e um controle. A avaliação da mortalidade das plantas foi realizada no 3º, 5º e 7º dia após aplicação do produto. Para a *Azolla* foram observados clorose (perda de clorofila) e necrose (morte das plantas) de acordo com a e Silva et al., (2012). E para a *Lemna* foram observados o aumento do número de frondes, clorose (perda de clorofila) e necrose (morte das plantas) de acordo com a OECD (2002) e Silva et al., (2012).

Tabela 1. Equação linear da reta e coeficiente de determinação para *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*.

Organismo	Equação da reta	Coeficiente R ²
<i>Lemna minor</i>	y = 5,08x + 14,10	0,89
<i>Azolla caroliniana</i>	y = 5,87x – 23,53	0,82

2.2. Ensaio de toxicidade aguda para o molusco

Para a realização dos ensaios de toxicidade aguda os exemplares de *P. canaliculata*, com peso entre $1,2 \pm 0,3$ g cada, foram aclimatados por dez dias em sala de bioensaio em aquários com capacidade de 60,0 L com sistema de aeração, sistema estático, com temperatura a $25,0 \pm 2,0$ °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, e alimentados uma vez ao dia, com a macrófita aquática submersa *Hydrilla verticillata*.

Inicialmente, para avaliar a sanidade e a sensibilidade dos organismos-teste foi realizado ensaio sensibilidade (CE50;48h) com a substância referência cloreto de potássio (KCl) com as concentrações: 0,10; 0,56; 1,00; 1,56 e 2,44 e 3,00 g L⁻¹ e o controle, com três réplicas e cinco caramujos por réplica e 3,0 L de solução teste. A sensibilidade (CL50;48h) do caramujo (*P. canaliculata*) a substância referência cloreto de potássio (KCl) foi de 1,49 g L⁻¹, com intervalo de confiança de 95% entre 1,23 a 1,82 g L⁻¹. A equação linear que representa a relação concentração-mortalidade é $y = 38,0x - 50,0$ com coeficiente de determinação de $R^2 = 0,87$.

Os ensaios definitivos de azametifós para o caramujo utilizaram-se as seguintes concentrações: 0,10; 1,07; 3,44; 11,16; 36,40; e 118,0 mg L⁻¹ e um controle. A avaliação da imobilidade foi realizada nos tempos de 24 e 48 horas. (Murty, 1988).

Durante o ensaio de toxicidade aguda para o organismo (*P. canaliculata*) foi realizado a análise das variáveis de qualidade de água (temperatura, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido), que se mantiveram dentro do recomendado pela ABNT (2016), norma de ecotoxicologia para peixes e adaptada para o caramujo neste estudo, em todas as concentrações e no controle, nos tempos 0h, 24h e 48h. (Tabela 2)

Tabela 2. Média e desvio padrão geral das concentrações das análises de qualidade do ensaio de toxicidade aguda para *P. canaliculata* exposto ao azametifós.

Tempos (horas)	Temperatura (°C)	Condutividade Elétrica (µS cm ⁻¹)	pH	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)
0h	25,64 ± 0,05	121,51 ± 0,04	8,32 ± 0,03	2,02 ± 0,04
24h	27,04 ± 0,03	125,34 ± 1,33	8,15 ± 0,03	1,16 ± 0,02
48h	25,87 ± 0,10	119,76 ± 1,78	8,07 ± 0,24	1,10 ± 0,03

2.3. Ensaio de toxicidade aguada para o *D. rerio* e *C. macropomum*

Os exemplares de zebrafish (*D. rerio*), com peso entre $0,6 \pm 0,3$ gramas, foram aclimatados em sala de bioensaio, em aquários com capacidade de 100 L. Os tambaquis (*C. macropomum*), com peso entre $1,9 \pm 0,17$ g, foram aclimatados durante dez dias em na sala de bioensaio em tanques com capacidade de 250,0 L, ambos os organismos com sistema de aeração contínuo promovido por bombas de ar, com temperatura a $25,0 \pm 2,0$ °C, com foto período de 12 horas de luz, e alimentados à vontade, uma vez ao dia, com ração comercial (28,0 a 32,0% de proteína bruta), por dez dias (ABNT, 2016).

Para avaliação da sanidade do lote de peixes foi realizado um ensaio de sensibilidade (CL50;48h) com a substância referência cloreto de potássio (KCl) com as concentrações: 0,10; 0,56; 1,00; 1,56 e 2,44 g L⁻¹ e o controle, com três réplicas, cada uma com três animais, com duração de 48 horas.

Nos ensaios definitivos com azametifós para peixes zebrafish (*D. rerio*) foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,10; 0,50; 0,80; 1,07 e 3,50 mg L⁻¹ e um controle, com três réplicas cada. A avaliação da mortalidade foi realizada nos tempos de 24 e 48 horas e foram observados também os sinais clínicos (Murty, 1988) de cada concentração.

Nos ensaios de toxicidade com o azametifós para peixes tambaqui (*C. macropomum*) foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,10; 1,07; 3,44; 11,16; 36,5 e 118,0 mg L⁻¹ e um controle, com três réplicas cada, conforme a classificação da USEPA (2017). A avaliação da mortalidade foi observada nos tempos de 24 e 48 horas e foram observados também os sinais clínicos de cada concentração.

Para o zebrafish (*D. rerio*) a sensibilidade ao cloreto de potássio (CL50;48h) foi de 1,46 g L⁻¹, com intervalo de confiança de 95% entre 1,07 e 1,98 g L⁻¹. Para tambaqui (*C. macropomum*) a (CL50;48h) foi de 1,0 g L⁻¹ sem intervalo de confiança. A equação linear que representa a relação concentração-mortalidade e coeficiente de determinação de ambas os peixes estão representados na tabela 03.

Tabela 3. Equação linear da reta e coeficiente de determinação para peixes.

Organismo	Equação da reta	Coeficiente R ²
<i>Colossoma macropomum</i>	$y = 30x - 45,55$	0,85
<i>Danio rerio</i>	$y = 24,74x - 42,26$	0,85

Durante o ensaio de toxicidade aguda para os organismos (*D. rerio*) e (*C. macropomum*) foi realizado a análise das variáveis de qualidade de água (temperatura, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido), que se mantiveram dentro do recomendado pela ABNT (2016), norma de ecotoxicologia para peixes, em todas as contrações e no controle, nos tempos 0h, 24h e 48h. (Tabela 4 e 5).

Tabela 4. Média e desvio padrão geral das concentrações das análises de qualidade do ensaio de toxicidade aguda para *D. rerio* exposto ao azametifós.

Tempos (horas)	Temperatura (°C)	Condutividade Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	pH	Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})
0h	23,55 $\pm$ 0,07	137,87 $\pm$ 0,3	8,81 $\pm$ 0,03	2,75 $\pm$ 0,3
24h	23,63 $\pm$ 0,4	140,68 $\pm$ 0,3	8,57 $\pm$ 0,01	2,98 $\pm$ 0,3
48h	26,27 $\pm$ 0,03	153,00 $\pm$ 1,4	8,67 $\pm$ 0,02	3,23 $\pm$ 0,2

Tabela 5. Média e desvio padrão geral das concentrações das análises de qualidade do ensaio de toxicidade aguda para *C. macropomum* exposto ao azametifós.

Tempos (horas)	Temperatura (°C)	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	pH	Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})
0h	21,5 $\pm$ 0,1	105,1 $\pm$ 3,0	8,4 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,7
24h	22,2 $\pm$ 0,1	112,8 $\pm$ 3,6	8,7 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 1,2
48h	22,6 $\pm$ 0,1	121,0 $\pm$ 6,1	8,6 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 1,0

2.4. Ensaio de toxicidade crônica para peixe tambaqui (*C. macropomum*)

Os exemplares de tambaqui (*C. macropomum*), com peso entre 85,00 $\pm$ 5,0 g, foram aclimatados em sala de bioensaio em caixas de 250,0 L com sistema de aeração contínuo promovido por bombas de ar, com temperatura a 25,0 $\pm$ 2,0 °C, com fotoperíodo de 12 horas, e alimentados com 2,5% do valor do peso total dos animais, uma vez ao dia, com ração comercial (32% de proteína bruta), durante o experimento.

Para o ensaio de toxicidade crônica, em 15 recipientes com capacidade para 60 litros com aeração e fluxo contínuo foram colocados 6 peixes. As concentrações de azametifós no ensaio de toxicidade crônica foram definidas através do ensaio de toxicidade aguda (Limite superior 2,03 mg L^{-1}) por fator de divisão de 2,5; 5,0; 10,0 e 50,0, com a obtenção das concentrações de 0,042; 0,21; 0,42 e 0,84 mg L^{-1} e um

controle, com três réplicas. O período de exposição que ao azametifós foi de 7 dias (ABNT NBR 15499:2007) e durante o ensaio foram observados os sinais clínicos de intoxicação (natação errática, perda da capacidade de arfagem, alteração na coloração, perda de apetite, letargia, corrosão de nadadeiras, hemorragia na pele, permanência na superfície da unidade, permanência no fundo da unidade e outros), conforme descrito por Murty (1988).

Durante o ensaio foi realizada a análise da qualidade das variáveis de água (pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e temperatura) nos tempos de 0, 1, 5 e 7 dias após a aplicação do produto (ABNT, 2016). Após os 7 dias de aplicação foi realizado a coleta dos órgãos, brânquias, fígado, cérebro e rim dos organismos sobreviventes para análises histológicas.

2.5. Análise histopatológica do tambaqui (*C. macropomum*)

Ao término do ensaio de toxicidade crônica do azametifós dos animais sobreviventes foram coletadas amostras de brânquias, cérebro, fígado e rim. Os órgãos foram retirados, seccionados longitudinalmente e imersos em solução fixadora de formol (10%) por 24 horas.

Após a fixação, os fragmentos passaram por desidratação, diafanização e inclusão em Histosec® (Merck). A seguir, foi realizada a microtomia em micrótomo manual, obtendo-se cortes de 3 a 5µm de espessura, corados com Hematoxilina-Eosina, e PAS (ácido periódico de Schiff) (Behmer et al., 1976).

2.6. Análises estatísticas

Os dados de toxicidade aguda e crônica foram submetidos à regressão linear e a estimativa da concentração letal (CL50) e efetiva (CE) pelo método de Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977) e classificação da ecotoxicidade de acordo com o proposto por US EPA (2017).

3. Resultados e Discussão

3.1. Toxicidade aguda do azametifós para as plantas aquáticas

No ensaio de toxicidade aguda azametifós para a *L. minor* a concentração letal (CL50;7d) foi de 6,63 mg L⁻¹ (Tabela 6). Na concentração 11,16 mg L⁻¹ ocorreu 62,0% de mortalidade e nas concentrações 36,5 e 118,0 mg L⁻¹, 100,0% de mortalidade. A *L. minor* foi menos

sensível ao inseticida azametifós do que ao herbicida imazapyr com CL50;7d de 1,06 mg L⁻¹ (Cruz et al., 2015), porém mais sensível em comparação ao inseticida teflubenzuron com CL50;7d de 1176,16 mg L⁻¹ (Medeiros et al., 2013).

Para a *A. caroliniana* a concentração letal 50% foi de 13,39 mg L⁻¹ (Tabela 6) com ocorrência de 29,0% de mortalidade das plantas em 11,16 mg L⁻¹. Em 36,5 e 118,0 mg L⁻¹ ocorreu 93,0 e 100,0% de mortalidade respectivamente. Esta macrófita aquática foi mais sensível do que o herbicida glyphosate na formulação (Scout®) foi pouco tóxico para a *Azolla caroliniana*, com CL50;7d de 23,66 mg L⁻¹ com limite inferior de 22,09 e superior de 25,34 mg L⁻¹ (Silva, et al., 2012).

Tabela 6. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológica do azametifós para as macrófitas testes.

Toxicidade aguda (mg L ⁻¹)	Limite inferior	CL50;7d	Limite superior	Classificação USEPA (2017)	Equação da reta	R ²
<i>Lemna minor</i>	5,32	6,53	8,02	Moderadamente tóxico	y = 6,45x – 22,43	0,88
<i>Azolla caroliniana</i>	11,04	13,39	16,24	Pouco tóxico	y = 5,90x – 23,81	0,79

3.2. Toxicidade aguda para o caramujo e peixes

Para o caramujo (*P. canaliculata*) a CE50;48h foi de 0,45 mg L⁻¹ (Tabela 7). No ensaio de toxicidade aguda não ocorreu imobilidade na concentração de 0,10 mg L⁻¹. Em 1,07 mg L⁻¹ ocorreu 86,0%, em 3,50 mg L⁻¹ foi de 93,0% e em 11,16; 36,5 e 118,0 mg L⁻¹, 100,0%. A equação linear que representa a relação concentração-mortalidade é y = 46,5x – 33,33 com coeficiente de determinação de R² = 0,80. O azametifós foi mais tóxico para o caramujo do que o parasiticida toltrazuril com CE50;48h de 7,59 mg L⁻¹ (Florêncio et al., 2014) e que o pesticida lambda-cialotrina (CE50;48h > 118,0 mg L⁻¹) e inseticida alfacipermetrina (28,76 mg L⁻¹) (Leonel et al., 2016).

Para o zebrafish (*D. rerio*) a CL50;48h do azametifós foi de 0,52 mg L⁻¹ (Tabela 7). Neste ensaio não ocorreu mortalidade na concentração 0,10 mg L⁻¹. Em 0,50 mg L⁻¹ ocorreu 22,0% de mortalidade, em 0,80 mg L⁻¹ ocorreu mortalidade de 88,0% e nas concentrações 1,07 e 3,50 mg L⁻¹, 100,0%. A equação linear que representa a relação concentração-mortalidade é y = 21x – 39,71 com coeficiente de determinação de R² = 0,85. Para o zebrafish foi observado os sinais de: natação errática, perda da capacidade de arfagem e permanência no fundo, nas concentrações 0,10 e 0,50 mg L⁻¹.

O azametifós foi mais tóxico para o zebrafish do que os inseticidas diflubenzuron (CL50;48h = 10,91 mg L⁻¹) e o temefós (7,30 mg L⁻¹) para o peixe mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) (Abe et al., 2019) e apresentou toxicidade similar ao carbofuran para tilápia (*O. niloticus*) com CL50;48h de 0,44 mg L⁻¹ (Americo-Pinheiro et al., 2020).

Para o tambaqui (*C. macropomum*) a CL50;48h foi de 1,40 mg L⁻¹ (Tabela 7). O azametifós não causou mortalidade em 0,50 mg L⁻¹. Na concentração 1,07 mg L⁻¹ ocorreu 33,0% e nas concentrações 3,50 e 11,16 mg L⁻¹, 100,0% de mortalidade dos organismos. A equação linear que representa a relação concentração-mortalidade é $y = 36,67x - 33,35$ com coeficiente de determinação de $R^2 = 0,89$. Para o tambaqui foi observado: natação errática, perda da capacidade de arfagem e permanência no fundo, nas concentrações 0,50 e 1,07 mg L⁻¹.

O azametifós foi mais tóxico para o tambaqui (1,40 mg L⁻¹) do que o ectoparasiticida trichlorfon (Masoten[®]) para juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) com CL50;48h = 84,0 µg L⁻¹ outro peixe de interesse para criação aquícola (Venturini et al., 2014); o clorpyrifós (OPs) para o peixe *Pseudotropheus maculatus* com CL50;96h = 6,61 µg L⁻¹ (Raibeemol et al., 2015); o inseticida teflubenzuron para a tilápia (*O. niloticus*) e para o pacu com CL50;48h > 1000,0 mg L⁻¹ (Ikefuti et al., 2015), o imidacloprid para tilápia com CL50;48h = 140,50 mg L⁻¹ (Américo-Pinheiro et al., 2019) e os inseticidas diflubenzuron (10,04 mg L⁻¹) e temefós (7,11 mg L⁻¹) para a tilápia (*O. niloticus*) (Abe et al., 2019).

Tabela 7. Toxicidade aguda e classificação ecotoxicológicos do azametifós para os organismos teste.

Toxicidade aguda (mg L ⁻¹)	Limite inferior	CE50/CL50	Limite superior	Classificação USEPA (2017)
<i>P. canaliculata</i>	0,32	0,45	0,64	Muito tóxico
<i>D. rerio</i>	0,39	0,52	0,71	Muito tóxico
<i>C. macropomum</i>	0,96	1,40	2,03	Moderadamente Tóxico

3.4. Toxicidade crônica para o organismo alvo tambaqui (*C. macropomum*)

Durante o ensaio de toxicidade crônica do azametifós para o tambaqui não ocorreu mortalidade dos organismos. A concentração de efeito não observado (CENO) foi de

0,84 mg L⁻¹ e a concentração efeito de observado de CEO > 0,84 mg L⁻¹ não sendo possível o cálculo médio de valor crônico (VC). Os inseticidas diflubenzuron e temefós também apresentaram valores baixos de CENO de 0,04 e 1,6 mg L⁻¹ para o mato grosso (*H. eques*) (Abe et al., 2019), enquanto o inseticida teflubenzuron apresentou concentração de efeito não observado > 20,0 mg L⁻¹ sem causar mortalidade para o pacu (*P. mesopotamicus*) após exposição de 7 dias (Ikefuti et al., 2015). A exposição crônica subletal do peixe *Pseudotropus maculatus* a 0,661 e 1,32 µg L⁻¹ de clorpirifos por 15 e 30 dias também não causou mortalidade (Raibeemol et al., 2020).

O valor de efeito observado estimado para o tambaqui (0,84 mg L⁻¹) não causou sinais clínicos de intoxicação durante os 7 dias de experimento.

Na avaliação de qualidade de água (oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH) não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos e o controle em nenhum período durante a exposição crônica do tambaqui ao azametifós (Tabela 8), exceto para a variável pH em de 0h e 3 dias, que apresentou redução significativa entre os tratamentos em relação ao controle (Tabela 6). Assim, qualidade de água permaneceu dentro das recomendações da ABNT NBR 15499 (2016) para ensaios de toxicidade crônica.

A variável de condutividade elétrica na fase inicial do ensaio estava alta devido à presença amônia (tabela 9) na água antes da aplicação do produto. Provavelmente devido as fezes e as excretas nitrogenadas dos peixes durante o período de aclimação dos animais. Desse modo o N-Amoniacal como parte destes nutrientes solubilizados aumentam a condutividade elétrica. Após a aplicação sequencial do azametifós por sete dias consecutivos, a condutividade elétrica não teve alterações significativas e os valores obtidos se mantendo dentro dos padrões da norma da ABNT (2016) (Tabela 8).

Tabela 8. Médias ± desvio padrão e análises estatística de qualidade de água para o teste de toxicidade crônica para o tambaqui, *C. macropomum*.

Concentração (mg L ⁻¹)	Temperatura (°C)			
	0h	1DAA	3DAA	7DAA
0,0	28,60±0,25 a	28,5±0,05 b	29,6±0,05 a	30,3±0,10 a
0,042	28,6±0,26 a	28,6±0,00 ab	29,4±0,05 b	30,2±0,00 a
0,21	28,2±0,11 a	28,6±0,00 ab	29,4±0,00 b	30,0±0,05 b
0,42	28,7±0,52 a	28,6±0,00 ab	29,4± 0,00 b	30,2±0,00 ab
0,84	28,7±0,04 a	28,8±0,10 a	29,4±0,00 b	30,2±0,05 ab

DMS (5%)	0,82	0,18	0,13	0,17
CV	1,07	0,23	0,17	0,2
F	1,22 ^{NS}	5,93NS	9,13*	6,08*
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)				
Concentração (mg L^{-1})	0h	1DAA	3DAA	7DAA
0,0	440,3 $\pm$ 209,4 a	177,1 $\pm$ 41,7 a	145,8 $\pm$ 2,68 a	150,7 $\pm$ 3,9 a
0,042	310,4 $\pm$ 159,2 a	159,7 $\pm$ 19,0 a	144,7 $\pm$ 1,76 a	149,0 $\pm$ 2,0 a
0,21	669,3 $\pm$ 233,5 a	169,8 $\pm$ 3,6 a	146,3 $\pm$ 1,58 a	154,8 $\pm$ 6,3 a
0,42	758,3 $\pm$ 275,1 a	202,5 $\pm$ 16,6 a	145,8 $\pm$ 0,36 a	152,6 $\pm$ 0,8 a
0,84	304,9 $\pm$ 70,6 a	153,5 $\pm$ 8,1 a	146,9 $\pm$ 1,15 a	154,2 $\pm$ 3,8 a
DMS (5%)	543,4	59,54	4,39	10,42
CV	40,71	12,84	1,12	2,54
F	3,17 ^{NS}	2,22 ^{NS}	0,77 ^{NS}	1,16 ^{NS}
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})				
Concentração (mg L^{-1})	0H	1DAA	3DAA	7DAA
0,0	2,2 $\pm$ 2,3 a	3,5 $\pm$ 1,2 a	3,5 $\pm$ 0,9 a	3,4 $\pm$ 1,6 a
0,042	2,8 $\pm$ 1,7 a	3,9 $\pm$ 1,2 a	4,4 $\pm$ 0,4 a	3,5 $\pm$ 1,0 a
0,21	2,4 $\pm$ 1,3 a	3,9 $\pm$ 0,5 a	3,9 $\pm$ 0,6 a	3,2 $\pm$ 1,3 a
0,42	3,2 $\pm$ 0,6 a	3,9 $\pm$ 0,6 a	4,2 $\pm$ 0,3 a	3,7 $\pm$ 0,6 a
0,84	2,04 $\pm$ 0,8 a	4,0 $\pm$ 0,3 a	4,0 $\pm$ 0,2 a	3,0 $\pm$ 0,6 a
DMS (5%)	4,1	2,32	1,53	3,02
CV	60,23	22,38	14,05	33,43
F	0,34 ^{NS}	0,14 ^{NS}	1,18 ^{NS}	0,18 ^{NS}
pH				
Concentração (mg L^{-1})	0H	1DAA	3DAA	7DAA
0,0	9,1 $\pm$ 0,24 a	8,2 $\pm$ 0,05 a	8,6 $\pm$ 0,05 a	8,5 $\pm$ 0,26 a
0,042	8,6 $\pm$ 0,05 ab	8,2 $\pm$ 0,05 a	8,4 $\pm$ 0,05 b	8,3 $\pm$ 0,05 a
0,21	8,5 $\pm$ 0,00 b	8,3 $\pm$ 0,00 a	8,4 $\pm$ 0,00 bc	8,3 $\pm$ 0,05 a
0,42	8,4 $\pm$ 0,00 b	8,3 $\pm$ 0,00 a	8,4 $\pm$ 0,00 bc	8,3 $\pm$ 0,05 a
0,84	8,5 $\pm$ 0,10 b	8,2 $\pm$ 0,00 a	8,3 $\pm$ 0,05 c	8,3 $\pm$ 0,00 a
DMS (5%)	0,61	0,12	0,12	0,33

CV	2,63	0,54	0,52	1,51
F	4,51*	0,50 ^{NS}	19,67*	1,15 ^{NS}

^{NS}Não Significativo. * Significativo a 5% de probabilidade. Médias com a mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 9. Médias $\pm$ desvio padrão e análise estatística de amônia para o teste de toxicidade crônica para o tambaqui, *C. macropomum*.

Concentração (mg L⁻¹)	1DAA	3DAA	7DAA
0,0	343,11 $\pm$ 108,11 a	747,2 $\pm$ 300,9 a	985,8 $\pm$ 282,5 a
0,042	293,89 $\pm$ 78,64 a	610,9 $\pm$ 196,3 a	824,5 $\pm$ 220,7 a
0,21	595,72 $\pm$ 206,22 a	1086,0 $\pm$ 419,5 a	1338,0 $\pm$ 519,0 a
0,42	519,41 $\pm$ 40,44 a	852,1 $\pm$ 89,4 a	1181,9 $\pm$ 120,9 a
0,84	574,68 $\pm$ 243,97 a	1045,1 $\pm$ 292,4 a	1369,8 $\pm$ 455,9 a
DMS (5%)	418,99	758,8	946,59
CV	33,5	32,52	30,9
F	2,35 ^{NS}	1,50 ^{NS}	1,31 ^{NS}

^{NS}Não Significativo. Médias com a mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p>0,05$).

Na análise histológica as brânquias dos animais do controle apresentaram padrão de peixes neotropicais e de outras espécies, constituída por uma lamela primária de onde partem as lamelas secundárias, com espaço interlamelar. Tanto as lamelas secundárias como o espaço interlamelar composto por células de sustentação, células mucosas (secretores de muco substanciais), células cloretos e tecido conjuntivo de sustentação similar ao padrão de outros peixes teleósteos como o pacu (*P. mesopotamicus*) (Santos et al., 2015)

Nos peixes expostos à concentração 0,021 mg L⁻¹ de azametifós a estrutura foi similar ao controle, porém ocorreu perda da capacidade de sustentação das lamelas secundárias e aumento da estase sanguínea (Figura 6).

Em 0,042 e 0,42 mg L⁻¹ ocorreu aumento da estase sanguínea e em algumas lamelas foi possível observar a presença de aneurisma no ápice, desorganização ou necrose das células do espaço interlamelar e fusão do ápice da lamela secundária. Em 0,84 mg L⁻¹, foi similar as concentrações anteriores, porém apresentou diminuição do epitélio interlamelar e estase sanguínea mais evidente. Essas alterações são similares às

observadas em brânquias de alevinos de tilápia (*O. niloticus*) expostos a 3,0 a 16,0 mg L⁻¹ de diflubenzuron (DFB); e em pacu (*P. mesopotamicus*) expostos a 35,0 mg L⁻¹ de atrazine (Abe et al., 2019; Santos et al., 2015).

Os efeitos causados pelo azametifós foram mais leves do que os observados em *O. niloticus* exposta a 0,0088 mg L⁻¹ carbofuran que foram: pacu (*P. mesopotamicus*) exposto a 3,0 mg L⁻¹ do herbicida glyphosate, edema subepitelial (Shiogiri et al., 2012), em *O. niloticus* exposta a 10,0 mg L⁻¹ do inseticida temefós com edema branquial (Abe et al., 2019), congestão sanguínea, aumento do epitélio interlamelar e perda da capacidade de sustentação a organização branquial (Américo-Pinheiro et al., 2020).

Porém as concentrações de 0,21 a 0,84 mg de azametifós L⁻¹ as alterações foram consideradas severas, similares as descritas para *O. niloticus* exposta a 3,0 mg L⁻¹ de diflubenzuron, que apresentaram perca de sustentação das lamelas e aneurisma (Abe et al., 2019).

Esses eventos, podem estar associados a um processo fisiológico em resposta a tóxicos que resultam em uma diminuição de contato entre o sangue e a água, e pode levar a insuficiência de suprimentos de oxigênio no sangue, que devidos aos danos no epitélio branquial, diminuem as trocas gasosas, causando distúrbio no sistema respiratório (Barillet et al. 2010; Tilak e Kumari, 2009).

O aneurisma de brânquia é uma grave patologia resultante do colapso da célula pilar so sistema e pode prejudicar a integridade vascular e causar rupturas do epitélio e subsequentes hemorragias e pode ser irreversível as brânquias dos peixes (Hinton e Laures, 1990; Nascimento et al. 2012).



Figura 6. A. Brânquia controle de Tambaqui (40x). B. Concentração 0,042 mg L⁻¹ de azametifós, perda da capacidade de sustentação das lamelas secundárias (40x). C. Concentração 0,42 mg L⁻¹ de azametifós, aumento da estase sanguínea nas lamelas (40x). D. Concentração 0,84 mg L⁻¹ de azametifós, diminuição do epitélio interlamelar (40x).

O fígado do tambaqui do controle da exposição ao azametifós, possui organização cordonal dos hepatócitos. A partir das veias centrais, formam-se os capilares sinusóides contendo em suas margens grupos de hepatócitos. Estes possuem formato levemente arredondado e o núcleo descolado para a periferia da célula. No citoplasma é possível identificar depósitos de glicogênio (PAS-Positivo). Também em algumas amostras histológicas foi possível identificar a presença do pâncreas exócrino envolvendo algumas veias centrais (Figura 7).

Nas concentrações 0,021 e 0,042 mg L⁻¹ ocorreu aumento do diâmetro dos capilares sinusóides e aumento no volume dos hepatócitos (hipertrofia), com desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos, em algumas regiões o núcleo com picnose e início de processo de necrose hepática. Onde a hipertrofia dos hepatócitos com deslocamento do núcleo para a periferia da célula, que ocorre devido ao número de organelas, como o

lisoretículo endoplasmático e complexo de Golgi que são responsável pelo metabolismo de toxinas (Ba-Omar et al. 2011; Carraschi et al. 2012).

Na concentração 0,42 mg L⁻¹ e 0,84 mg L⁻¹ foi similar aos demais, com picnose do núcleo dos hepatócitos. Estas alterações hepáticas também ocorreram em *O. niloticus* exposta por 7 dias a 0,0440 e 0,0888 mg de carbofuran L⁻¹ (Américo-Pinheiro et al., 2020).

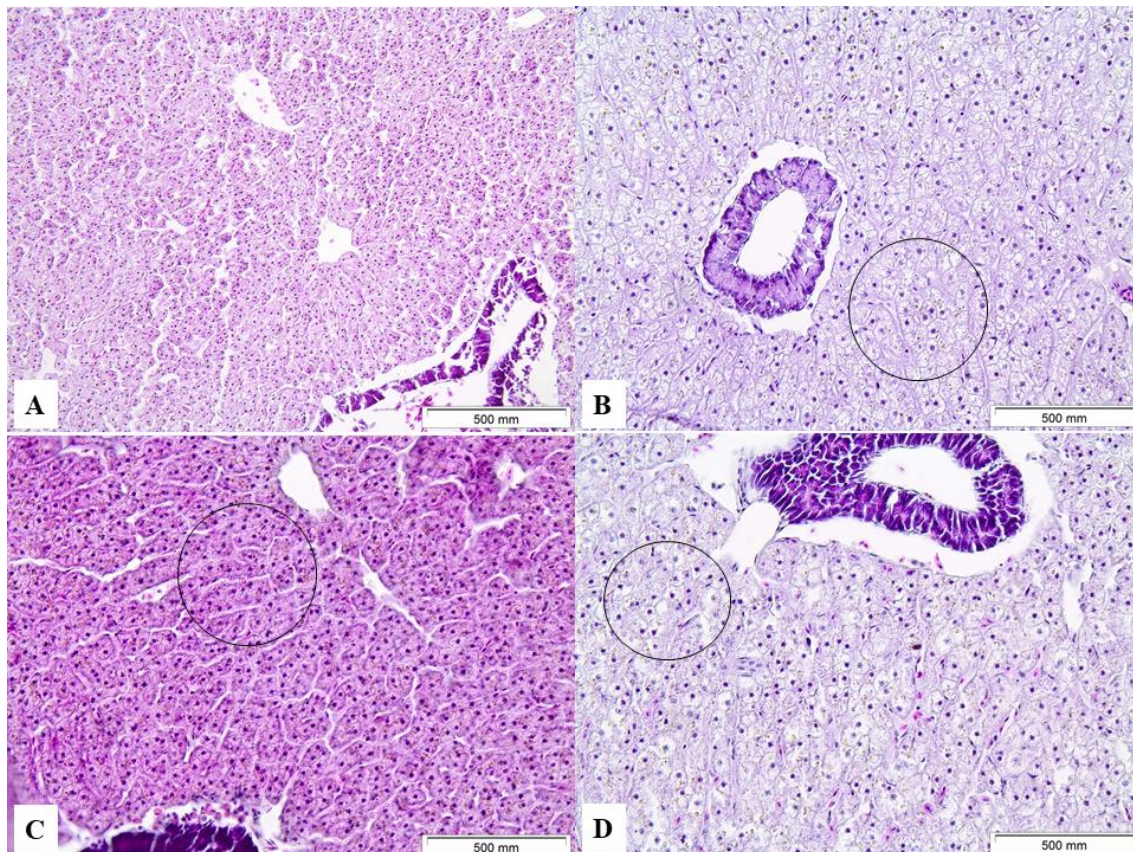


Figura 7. **A.** Fígado controle de Tambaqui (40x). **B.** Concentração 0,042 mg L⁻¹ de azametifós, aumento do diâmetro do capilar sinusóide e aumento no volume dos hepatócitos (40x). **C.** Concentração 0,42 mg L⁻¹ de azametifós, desorganização do arranjo cordonal dos hepatócitos (40x). **D.** Concentração 0,84 mg L⁻¹ de azametifós, núcleo com picnose e início de processo de necrose hepática (40x).

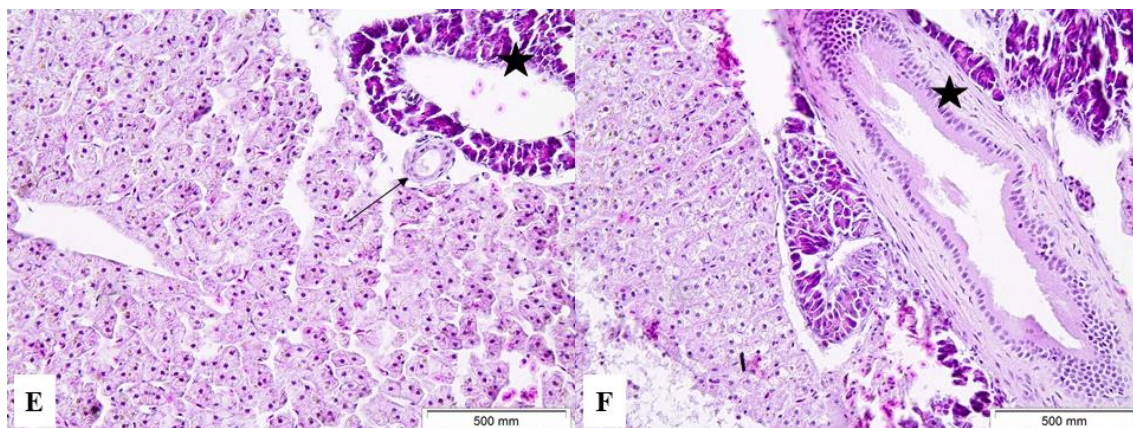


Figura 8. E e F. Fígado controle de Tambaqui, presença do canal biliar e pâncreas exócrino (40x).

Esses eventos, portanto, podem ser associados ao mecanismo de defesa contra tóxicos circundantes, uma vez que o fígado é o principal local do processo de desintoxicação, as alterações ocorrem na tentativa de eliminar o produto durante o processo de desintoxicação (Abe et al., 2019).

O rim de tambaqui é formado histologicamente por túbulos contorcidos distais, proximais, com glomérulos e presença de tecido hematopoiético. Nestas estruturas ocorre a presença de tecido conjuntivo frouxo muito delgado e células intersticiais. O glomérulo é revestido pela cápsula glomerular, composta por tecido conjuntivo delgado. Os túbulos contorcidos distais são compostos por epitélio prismático simples ciliado. Suas células apresentam núcleo basófilo e citoplasma acidófilo, enquanto, dos túbulos proximais são arredondados e suas células são menos reativas ao padrão acidófilo-basófilo (Figura 9).

Na concentração 0,021 e 0,042 mg L⁻¹ de azametifós, ocorreu diminuição do volume glomerular, com desprendimento da capsula glomerular. Nas concentrações 0,42 e 0,84 mg L⁻¹ além das alterações anteriores também ocorreu desorganização da estrutura de sustentação dos túbulos contorcidos, apresentando necrose de células dos túbulos.

Os resultados do presente trabalho foram similares aos encontrados por Mishra et al. (2008) para *Channa punctatus* (Bloch) sem exposição de produto apresentou no rim na histologia do tronco, o componente excretor caracterizado pelos túbulos renais e cápsulas de Bowman com glomérulos distribuídos no interstício dos tecidos hematopoiéticos. Os resultados da exposição aguda ao cromo 40 mg L⁻¹ alterou os

componentes do tronco do rim, sendo observado hipertrofia das células epiteliais dos túbulos renais com a consequente redução de lúmens intubulares.

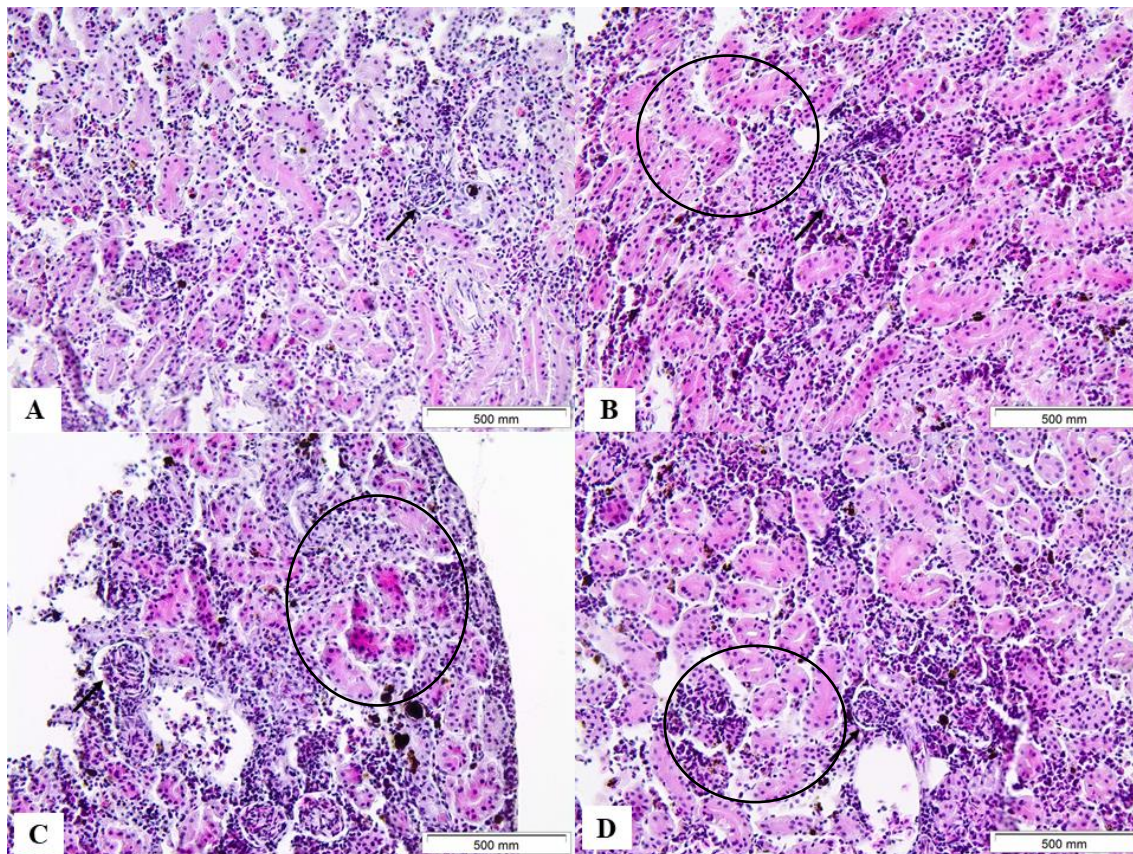


Figura 9. **A.** Rim controle do tambaqui, presença de glomérulos (40x). **B.** Concentração $0,042 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, presença de glomérulos, diminuição do volume glomerular. **C.** Concentração $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, presença de glomérulos, desorganização da estrutura de sustentação dos túbulos contorcidos (40x). **D.** Concentração $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, presença de glomérulos, necrose de células dos túbulos (40x).

O tecido nervoso central dos peixes controle é formado por neurônios e células da glia. Os neurônios ocupam determinadas regiões do encéfalo (SNV). A região de córtex cerebelar é formada por suas camadas: molecular e granulosa, no limite entre as duas camadas ocorre a presença de células de Purkenji (Figura 10). A camada granulosa é formada por pequenos corpos de neurônios. Os espaços claros entre as células granulosas é o local onde ocorre as sinapses celulares. Na camada molecular estão visíveis corpos dos neurônios, os axônios e as sinapses, além das células de glia. Na região do mesencéfalo abaixo da camada granulosa, é possível observar a região

ependimária, composta por células ependimares que reveste os ventrículos do cérebro. Este epitélio de revestimento simples é formado por células cúbicas ciliadas.

Na concentração $0,042 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,21 \text{ mg L}^{-1}$ foram similares ao controle. E nas concentrações $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ ocorreu estase sanguínea no interior da camada molecular (Figura 10).

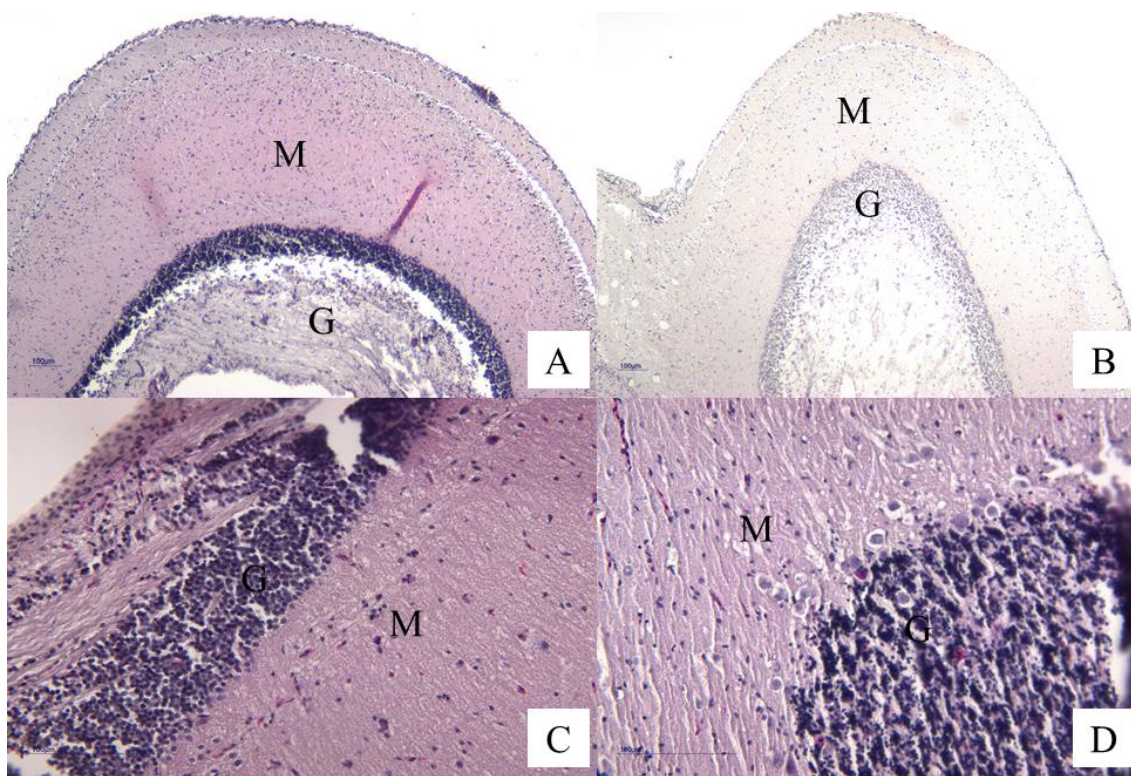


Figura 10. A. Cérebro controle do tambaqui. (M:Camada molecular e G: Camada granulosa) B. Concentração $0,042 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, sem alterações. C e D. Concentração $0,42$ e $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, estase sanguínea no interior da camada molecular (40x).

4. Conclusão

A toxicidade relativa do azametifós indica efeito muito tóxico para os bioindicadores caramujo e zebrafish e para o tambaqui (*C. macropomum*). Em exposição crônica o inseticida apresentou efeito subletal com alterações histopatológicas nos principais tecidos do peixe.

5. Referências

- Abe, F.R.; Machado, A.A.; Coleone, A.C.; Cruz, C.; Machado-Neto, J.G. Toxicity of Diflubenzuron and Temephos on Freshwater Fishes: Ecotoxicological Assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. *Water Air Soil Pollut.*, v. 230, n. 77, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4128-7>.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088:2016. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda. São Paulo, 3ª edição, 25p., 2016.
- Affonso, E. G. et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 133, n. 3, p. 375–382, 2002.
- Américo-Pinheiro, J.H.P.; Cruz, C.; Aguiar, M.M.; Torres, N.H.; Ferreira, L.F.R.; Machado-Neto, J.G. Sublethal effects of imidacloprid in hematological parameters of tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Water Air Soil Pollut.* v. 230, n. 193, p. 5-7, 2019.
- Américo-Pinheiro, J.H.P.; Machado, A.A.; Cruz, C.; Aguiar, M.M.; Ferreira, L.F.R.; Torres, N.H.; Machado-Neto, J.G. Histological Changes in Targeted Organs of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Sublethal Concentrations of the Pesticide Carbofuran. *Water Air Soil Pollut.*, v. 231, n. 228, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04628-5>
- Araújo, J.O.; Lopes, Jr.H.O.; Brust, S.M.S.; Pinto, L.R. Alterações hematológicas em juvenis de tambaqui expostos ao petróleo e dispersante. In: 1º Congresso Internacional PIATAM, Manaus. Integridade Biótica na Amazônia, 2005.
- Assis, C. R. D. et al. Effect of dichlorvos on the acetylcholinesterase from tambaqui (*Colossoma macropomum*) brain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 7, p. 1451–1453, 2007.
- Ba-Omar, T. A., Al-Jardani, S., & Victor, R. Effects of pesticide temephos on the gills of *Aphanius dispar* (Pisces: Cyprinodontidae). *Tissue & Cell*, v.43, p.29–38, 2011.
- Barillet, S., Larno, V., Floriani, M., Devaux, A., & Adam-Guillermin, C. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. *Aquatic Toxicology*, v.100, p.295–302. 2010.
- Behmer, A. O., Talosa, C. M. E., Neto, F. G. A. Manual De Técnicas Para Histologia Normal e Patológica. EDART. Edit, 1976.
- Bennicelli, R. et al. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metal (Hg (II), Cr (III), Cr (VI)) from municipal wastewater. Short communication. *Chemosphere*, v. 55, n. 1, p. 141-146, 2004.

Brust, S.M.A.; Pinto, L.R. Efeitos do petróleo e do dispersante químico em juvenis de tambaqui. In: 1º Congresso Internacional PIATAM – Ambiente, Homem, Gás e Petróleo, Manus. Integridade Biótica na Amazônia, 2005.

Carraschi, S. P., Cruz, C., Machado-Neto, J. G., Ignácio, N. F., Barbuio, R., & Machado, M. R. F. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with aeromonas hydrophila and treated with antibiotics. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.83, p.115–120, 2012.

Carraschi, S.P.; Florencio, T.; Garlich, N.; Silva, A.F.; Marques, A.M.; Cruz, C.; Paiva, M.J.T.R. Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, v. 7, n. 3, p. 3136, 2016.

Cruz C, Silva Af, Shiogiri Ns, Garlich N, Pitelli Ra. Imazapyr herbicide efficacy on floating macrophyte control and ecotoxicology for non-target organisms. Planta Daninha. v.33 n.1. p.103-8, 2015.

Dairiki; Silva, 2011. Revisão de Literatura: Exigências nutricionais do tambaqui - compilação de trabalhos, formulações de ração e desafios futuros. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, p. 48, 2011. Disponível em: <http://www.infoteca.cnpp>

Della Vechia JF, Cruz C, Silva AF, Cerveira Jr WR, GarlichN. Macrophyte bioassay applications for monitoring pesticides in the aquatic environment. Planta Daninha. v. 34. n. 3. p. 597-603, 2016.

Duarte, R. M.; Honda, R. T.; Val, A. L. Acute effects of chemically dispersed crude oil on gill ion regulation, plasma ion levels and haematological parameters in tambaqui (*Colossoma macropomum*). Aquatic Toxicology, v. 97, n. 2, p. 134–141, 2010.

Ebele AJ, Abdallah Ma-E, Harrad S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. Emerg Contam. v.3. p.1-16, 2017.

Fávaro, L. F.; Oliveira, E. C. Ecologia reprodutiva em peixes. In: RIBEIRO, C. A. O.;

Ferreira Da Costa, O. T. et al. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae), to short-term exposure to nitrite. Aquaculture, v. 232, n. 1-4, p. 627–636, 2004.

Florencio, T. Carraschi, S.P. Cruz, C. Silva, A.F. Marques, A.M. Pitelli. R.A. Bioindicadores neotropicais de ecotoxicidade e risco ambiental de fármacos de interesse para a agricultura. Bol. Inst. Pesca. v.40. n.4. p. 569-576, 2014.

Garlich N, Cruz C, Silva Af, Carraschi Sp, Malaspina Ic, Pitelli Ra, Bianco S. Diquat associated with copper sources for algae control: Efficacy and ecotoxicology. J Environ Sci Health Part B. v.51.v n.4. p.215-21, 2016.

Grefrud, Es., Glover, K., Grosvik, Bf., Husa, V., Karlse, O., Kristiansen, T., Kvamme, Bo., Mortensen, S. Samuelsen, Ob, Stien, Lh., Svasand, T., (red). Risikorapport norsk fiskeoppdrett. Fisken og havet. Snnr 1, 2018.

Guimarães, F.P. Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

Hamilton, M.A. Russo, R.C. Thurston, V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol., v.11, n.7, p.714-719, 1977.

Hill, A.J. Teraoka, H. Heideman, W. Peterson, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicological Sciences., v.86, p.6-19, 2005.

Hinton, D. E., & Lauren, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In R. Adams & R. Lloyd (Eds.), Biological indicators of stress in fish. Bethesda: American Fisheries Society.1990.

Ikefute, C. V.; Carraschi, S. P.; Barbuio R.; Cruz C.; Pádua S. B.; Onaka E. M.; Ranzani-Paiva, M. J. T. Teflubenzuron as a tool for control of trichodinids in freshwater fish: Acute toxicity and in vivo efficacy. Experimental Parasitology, v. 154, p. 108–112, 2015.

Jardim, G. M. Estudos ecotoxicológicos da água do sedimento do Rio Corumbataí, SP. 2004. 119 p. Dissertação (Mestrado) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

Johannessen, B. Methods of combatting sea lice. Patent no. US 9538758 B2, Date of patent: Jan. 10, Inventor Baard Johannessen., in: Patent, US (Ed.), 2017.

Langford, Kh., Oxnevad, S., Schoyen, M. Thomas, Kv. Do antiparasitic medicines used in aquaculture pose a risk to the Norwegian aquatic environment? Environ. Sci. Technol. v. 48, p. 7774-7780, 2014.

Leonel, K. P. Morandi, J. M. Brunetti, I. A. Aparicio, L. D. B. Da Cruz, Claudinei. Toxicidade aguda de inseticidas e espalhante usados no controle de vetores para o bioindicador (*Pomacea canaliculata*). Ciência e Cultura (Barretos), v. 12, p. 45, 2016.

Lins, J. A. P. N.; Kirschnik, P. G.; Da Silva Queiroz, V.; Cirio, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. Revista Acadêmica: Ciência Animal, 8(4). 2017.

Love, D. C.; Fry, J. P.; Cabello, F.; Good, C. M.; Lunestad, B. T. Veterinary drug use in United States net pen Salmon aquaculture: Implications for drug use policy. Aquaculture, v. 508, 2020.

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

Marcon, J. L.; Filho, D. W. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology, v. 123, n. 3, p. 257-63, 1999.

Matsuo, A. Y. O.; Wood, C. M.; Val, A. L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology*, v. 74, p. 351-364, 2005.

Medeiros, L.S.; Souza, J.P.; Winkaler, E.U.; Carraschi, S.P.; Cruz, C.; Souza-Junior, S.C.; Machado-Neto, J.G. Acute toxicity and environmental risk of teflubenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the absence and presence of sediment. *J. Environmental Science and Health, Part B.*, v. 48, p. 600-606, 2013.

Mishra, K. A. Mohanty, B. Chronic exposure to sublethal hexavalent chromium affects organ histopathology and serum cortisol profile of a teleost, *Channa punctatus* (Bloch). *Science of the total environment*, v. 407, n. 18, p. 5031-50381, 2008.

Murty, A.S. Toxicology of pesticide to fish. Boca Raton: CRC Press. v. 1, 1988.

Nascimento, A. A., Araújo, F. G., Gomes, I. D., Mendes, R. M. M., & Sales, A. Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized Tropical River in South-Eastern Brazil. *Anatomia Histologia Embryologia*, v.41, p.209-216, 2012.

Noga, E. J. Fish disease: diagnosis and treatment. 2nd edition. Ames (IA):: Wiley Blackwell; 2010.

OECD, Organization For Economic Co-Operation And Development. Guidelines for the testing of chemicals, *Lemna* sp. Growth inhibition test. Paris-França: 22p. 2002.

Oliveira, S.S.; Brandão, V.M.; Chippari-Gomes, A.R.; Paula-Silva, M.N.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. Estudo da enzima Glutathione-S-Transferase como biomarcador no monitoramento do trecho Coari-Manaus em três espécies de peixes. In: 1º Congresso Internacional PIATAM, Manaus. Integridade Biótica na Amazônia, 2005.

Rae, G. H. Sea louse control in Scotland, past and present. *Pest Manag. Sci.* 58,515-520, 2002.

Raibeemol, K.P.; Chitra, K.C. Induction of immunological, hormonal and histological alterations after T sublethal exposure of chlorpyrifos in the freshwater fish,

Pseudetroplus maculatus (Bloch, 1795). Fish and Shellfish Immunology., v. 102, p. 1-12, 2020.

Rand, G.M.; Petrocelli, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology. Washigton: Publinshing Hemisphere, p. 665, 1985.

Rico, A. et al. Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. Ecotoxicology, v. 20, n. 4, p. 625–634, 2011.

Saint-Paul, U. Ecological and Physiological investigations of *Colossoma macropomum*, a new species for fish culture in Amazonia. Memorias de La Asociation Lalinoamericana de Acuicultura, v. 5, p. 501-518, 1984.

Salazar-Lugo, R. et al. Short communication Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomum* exposed to paraquat at different temperatures. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 31, n. 3, p. 490–495, 2011.

Samuelsen, Ob., Lunestad, Bt., Hannisdal, R. Bannister, R., Olsen, As., Tjensvoll, T., Farestveit, E., Ervik, A. Distribution and persistence of the anti sea-lice drug teflubenzuron in wild fauna and sediments around a salmon farm, following a used to treat salmon lice on non-target species: evidence from a systematic review. Sci. Total Environ. V. 649, p. 1124-1136, 2015.

Sanford, M.; Washuck, N.; Carr, K.; Prosser, R. S. Pulsed exposure of the macrophyte *Lemna minor* to herbicides and the mayfly *Neocloeon triangulifer* to diamide insecticides. Chemosphere, October 2020.

Santos, E.A.; Cruz, C.; Carraschi, S.P.; Silva, J.R.M.; Botelho, R.G.; Velini, E.D.; Pitelli, R.A. Atrazine levels in the Jaboticabal water stream (São Paulo State, Brazil) and its toxicological effects on the pacu fish *Piaractus mesopotamicus*. Arh Hig Rada Toksikol., v. 66, p. 73-82, 2015.

Shiogiri, N S, et al. Effects of azithromycin on tilapia (*Oreochromis niloticus*): health status evaluation using biochemical, physiological and morphological biomarkers. Aquaculture Research, p. 1–15, 2016.

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

Sundin, L. et al. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). The Journal of Experimental Biology, v. 203, n. 7, p. 1225–1239, 2000.

Tilak, K. S., & Kumari, R. S. Acute toxicity of Nuvan®, an organophosphate to

freshwater fish *Ctenopharyngodon idella* and its effect on oxygen consumption. *Journal of Environmental Biology*, v.30, n.6, p.1031–1033, 2009.

United States Environmental Protection Agency – US EPA. 2017. Technical Overview of ecological risk. Assessment – Analysis Phase: Ecological Effects characterization. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment>. Acesso em: 14/05/2018.

Venturini, F.P. Cruz, C. Pitelli, R.A. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*). *Acta Sci. Biol. Sci.*, v.30. n.2, p.179-184, 2008.

Venturini, Francine P.; Moraes, Fernanda D.; Cortella, Lucas R. X.; Rossi, Priscila A.; Cruz, Claudinei; Moraes, Gilberto. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 299-309, 2014.

Xu, Y.; Jing, A.; Li, K.; Qin, J.; Li, H. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development and growth of invasive snail (*Pomacea canaliculata*). *Aquatic Toxicology*, v.193, p. 136-143, 2017.

Manuscrito 2

Avaliação hematológica e histopatológica do tambaqui (*Colossoma macropomum*) após tratamento e recuperação com inseticida azametifós

**Isabella Alves Brunetti^{1*}, Pâmela Castro Pereira², Camila Aparecida Faleiros³,
Cecilia Alves de Pádua³, Nathália Garlich³, Claudinei da Cruz³, Maria José
Tavares Ranzani de Paiva¹**

¹ Centro de Aquicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, s/n, Zonal Rural, Jaboticabal (SP), Brasil. Cep: 14884-900.

*E-mail: isabella.abrunetti@hotmail.com

²Unesp FCAV – Produção Vegetal, campus Jaboticabal-SP.

³Centro Universitário da fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, departamento LEEA – Laboratório de Ecotoxicologia e Eficácia dos Agrotóxicos.

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar o perfil hematológico e histopatológico do organismo alvo, tambaqui (*C. macropomum*), submetido ao ensaio de simulação de tratamento com azametifós e a recuperação. Os exemplares de tambaqui com peso entre 95,0 a 100,0 g, foram aclimatados e alimentados com ração comercial. O ensaio de simulação de tratamento e recuperação foi realizado em triplicata, montado em caixas contendo 60,0 litros, com aeração e fluxo contínuo. Cada réplica continha 6 exemplares expostos ao azametifós e ao final de sete dias foram coletados três peixes de cada caixa. Posteriormente, os outros organismos foram mantidos nas caixas por mais 21 dias sem aplicação de produto para avaliação de recuperação. As concentrações aplicadas no ensaio de 0,042 mg L⁻¹, 0,21 mg L⁻¹, 0,42 mg L⁻¹, 0,84 mg L⁻¹ e controle. Para análises hematológicas, amostras de sangue dos peixes, foram coletadas por punção caudal. As amostras foram usadas para determinar as seguintes variáveis: hematócrito (Ht) teor de hemoglobina (Hb) contagem de glóbulos vermelhos (RBC) e cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (MCV), concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC) e hemoglobina corpuscular média (HCM). Foram coletadas amostras de brânquias, cérebro, fígado e rim dos animais e imersos em solução fixadora de formol (10%) e seguiu-se a rotina histológica convencional. Após

21 dias de recuperação, os organismos apresentaram aumento das taxas de VCM, HCM e CHCM em relação aos peixes avaliados após 7 dias de tratamento de azametifós. Para os leucócitos, ocorreu aumento de número de monócitos, neutrófilo e linfócitos após 7 dias de aplicação do azametifós. Após 21 dias de recuperação houve diminuição dos leucócitos em todas as concentrações em relação ao controle, mostrando que o tempo de 21 dias foi eficaz para a recuperação dos peixes. Para as análises histológicas com 7 dias de tratamento, todas as amostras apresentaram alterações significativas em relação ao controle. Após os 21 dias de recuperação do tratamento, as análises histológicas demonstraram que o tecido nervoso e hepático apresentou 100% de recuperação em todas as concentrações testadas. Nas brânquias, apenas nas concentrações 0,042 e 0,21 mg L⁻¹ ocorreu recuperação das lamelas branquiais e no tecido renal as células não foram recuperadas após os 21 dias. Assim, o ensaio de simulação de tratamento com o azametifós causa alterações histopatológicas transitórias, com recuperação dos tecidos branquiais, nervoso, hepático e do sangue após 21 dias.

Palavras-chaves: Sangue, histologia, peixe, pesticida.

Abstract

The aim of this study was to determine the hematological and histopathological profile of the target organism, tambaqui (*Colossoma macropomum*), submitted to the azametiphos treatment simulation test and recovery. The tambaqui specimens weighing between 95.0 to 100.0 g, were acclimated and fed with commercial feed. The treatment and recovery simulation test was performed in triplicate, assembled in boxes containing 60.0 liters, with aeration and continuous flow. Each replica contained 6 specimens exposed to the azametiphos product for 7 consecutive days. Three fish were collected from each box. Subsequently, the other organisms were kept in the boxes for another 21 days without application of product for evaluation of recovery. Test concentrations of 0.042 mg L⁻¹, 0.21 mg L⁻¹, 0.42 mg L⁻¹, 0.84 mg L⁻¹ and control. For hematological analyzes, blood samples from the fish were collected by caudal puncture. The samples were used to determine the following parameters: hematocrit (Ht) hemoglobin content (Hb) red blood cell count (RBC) and calculation of hematimetric indices: mean corpuscular volume (MCV), mean concentration of corpuscular hemoglobin (MCHC) and hemoglobin mean corpuscular (HCM). Samples of gills, brain, liver and kidney

were collected from the animals and immersed in a formaldehyde fixing solution (10%) and the conventional histological routine was followed. After 21 days of recovery, the organisms showed increased rates of VCM, HCM and CHCM in relation to the hematological profile during the 7 days of treatment of azametiphos. For leukocytes, there was an increase in the number of monocytes, neutrophils and lymphocytes after 7 days of azametiphos application. After 21 days of recovery, there was a decrease in leukocytes in all concentrations compared to the control, showing that the 21-day time was effective for the recovery of fish. For histological analyzes with 7 consecutive days of azametiphos treatment, all samples showed significant changes in relation to the control. After 21 days of recovery from treatment, histological analysis showed that nervous and hepatic tissue showed 100% recovery of cells at all concentrations tested. In the gills, only 0.042 and 0.21 mg L⁻¹ recovered the gill lamellae and in the renal tissue, the cells were not recovered after 21 days. Thus, the azametiphos treatment simulation test causes transient histopathological changes, with recovery after 21 days without application, in the branchial, nervous, hepatic and blood tissues and not causing significant hematological changes in tambaqui, however azametiphos has been shown to cause no damage to tambaqui.

Keywords: Blood; histology; fish; pesticide.

1. Introdução

O monitoramento de ambientes aquáticos é um processo importante e necessário no gerenciamento dos recursos naturais, pois oferece a oportunidade de diagnosticar os possíveis impactos causados pela ação antrópica (Castro et al., 2019).

Em ambientes desfavoráveis, os peixes são expostos a vários agentes patogênicos em que seu sistema de defesa desempenha um papel importante (Mohebbi et al., 2011; Dorucu et al., 2009). Contudo na maioria das vezes é necessário a intervenção e o tratamento com produtos químicos.

Na aquicultura, os inseticidas organofosforados (OPs) são os mais utilizados para o controle de larvas de insetos predadores de peixes e eliminação de ectoparasitos (Mataqueiro, 2002; da Rocha, 2009). Entretanto devido ao fato de escassez de

conhecimento, grandes quantidades de organofosforados são utilizadas nos ambientes aquáticos e os peixes são frequentemente expostos a estas substâncias bioacumulativas (Dores; De-Lamonica, 2001; Canello Schalch et al., 2005).

O organofosforado azametifós é aplicado em alguns países produtores de salmonídeos no Oceano Atlântico e no Chile, para tratamento contra várias espécies de piolhos do mar (Aaen et al., 2015). Os organofosforados inibem o efeito da acetilcolinesterase (AChE), levando a um acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica (Casida e Durkin, 2013). Isso atrapalha os impulsos neurais normais e os piolhos ficam paralisados e caem do peixe.

Os compostos organofosforados têm sido amplamente utilizados como inseticida, acaricida e compostos anti-helmínticos por várias décadas. O triclorfon [ácido fosfônico, (2,2,2-tricloro-1-hidroxietil) -dimetil éster] pode ser oral, topicamente ou parenteralmente usados para controlar parasitas em várias espécies animais. É empregado em tratamentos de peixes de água doce infestados por *Argulus sp.*, *Ergasilus sp.*, *Lernea sp.*, *Dactylogyrus sp.*, *Trichodinas sp.* e contra piolhos do mar no salmão, em carpas, trutas e enguias. (Burrige et al. 2010);

Os ensaios de recuperação podem contribuir para observar desequilíbrios do metabolismo antioxidante expostos a *Spirulina platensis* (Marigoudar et al. 2013; Bacchetta et al. 2014; Abdelkhalek et al. 2015). Alguns órgãos são altamente responsivos à exposição química, como brânquias, que são os primeiros órgãos em contato com o ambiente e a água e fígado, que desempenha um papel vital no metabolismo e desintoxicação de estressores químicos (Venturini et al., 2019).

Neste contexto de monitoramento das alterações por fármacos, a hematologia consiste em estudar as alterações dos padrões e possíveis distúrbios morfológicos das células existentes no sangue. Seu estudo é baseado pela quantificação de eritrócitos, leucócitos e trombócitos (Tavares-Dias; Moraes, 2004), assim como nos demais componentes existentes tais como, proteína plasmática, hemoglobina, entre outros. Os parâmetros sanguíneos assim como bioquímicos e enzimáticos, auxiliam na condução de estudos sobre contaminação ambiental (Silva et al. 2012).

Segundo Adhikari et al. (2004), os parâmetros hematológicos podem ser considerados com indicadores fisio-histopatológicos de um corpo como todo, sendo

assim, uma das peças fundamentais para o diagnóstico da funcionalidade do sistema do peixe exposto a um contaminante. A utilização da hematologia como biomarcador ambiental, pode permitir uma avaliação mais rápida da saúde dos organismos, podendo ser indicadores da exposição ou de efeito de xenobióticos (Mayer et al., 1992; da Rocha, 2009). Além disso, análises hematológicas auxiliam na determinação da fisiologia de um organismo e pode refletir indicadores ambientais e os efeitos tóxicos de produtos químicos (Gabriel et al. 2007; Ghaffar et al. 2014).

Outra ferramenta são as análises histológicas, importantes como biomarcadores na avaliação dos efeitos subletais de contaminantes ou patógenos. Além disso, as mudanças histológicas fornecem uma resposta rápida para auxiliar na identificação de estressores e detectar seus efeitos nos tecidos (Bernet et al. 1999; Moon et al. 2006; Figueiredo-Fernandes et al. 2007).

Baseado nas premissas de boas práticas de manejo, o desenvolvimento e prospecção de novas moléculas é fundamental na tomada de decisão sobre o desenvolvimento da piscicultura brasileira. O azametifós possui registro em outros países, mas é necessária sua avaliação em condições e modelos biológicos brasileiros.

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é um peixe nativo da bacia amazônica de grande importância econômica (Matsuo; Wood; Val, 2005; Salazar-Lugo et al., 2011) e se destaca como a espécie mais cultivada no Brasil (MPA, 2011). Este peixe tem sido utilizado como bioindicado em estudos da qualidade ambiental e tem potencial nos estudos ecotoxicológicos.

O tambaqui foi utilizado em estudos de toxicidade com o dicloreto de paraquate (Salazar-Lugo et al., 2011) e herbicida não-seletivo à base de glifosato (Braz-Mota et al., 2015). Diante disto, estudos utilizando o tambaqui são necessários devido à sua ampla criação comercial no Brasil bem como em outros países da América do Sul (Ferri, 2019). Assim, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil hematológico e histopatológico do organismo alvo, tambaqui (*C. macropomum*), submetido ao ensaio de simulação de tratamento com azametifós e recuperação, após 21 dias.

2. Material e Métodos

Para realização dos ensaios de toxicidade foi utilizado o ingrediente ativo azametifós $C_{19}H_{10}ClN_2O_5P_5$, CAS. 35575-96-3, que pertence ao grupo químico dos organofosforados da classe dos inseticidas, com classificação toxicológica III – moderadamente tóxico. O produto é solúvel em água e sua composição é de: Azametifós 1,0 % p/p + atrativos e veículo (inertes).

O projeto passou por aprovação na Comissão de ética no uso de animais – CEUA no Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, protocolo n° 06_2019.

2.1. Simulação de tratamento e recuperação do organismo alvo tambaqui (*C. macropomum*)

Os exemplares de tambaqui (*C. macropomum*), com peso entre $95,0 \pm 5,0$ g, foram aclimatados em sala de bioensaio em caixas de 250,0 L com sistema de aeração contínua promovido por bombas de ar, com temperatura a $25,0 \pm 2,0$ °C, com fotoperíodo de 12 horas, e alimentados com 2,5% do valor do peso total dos animais, uma vez ao dia, com ração comercial (28,0 a 32,0% de proteína bruta), durante 30 dias.

O ensaio de simulação de tratamento e recuperação foi realizado em triplicata, em caixas de 60,0 litros, com aeração e fluxo contínuo. Cada réplica continha 6 exemplares expostos ao produto azametifós por 7 dias e o controle, adaptados a norma da ABNT NBR 15499:2007. Foram coletados três peixes de cada réplica de cada tratamento. Posteriormente, os outros organismos foram mantidos nas caixas por mais 21 dias sem aplicação de produto para avaliação de desintoxicação.

As concentrações aplicadas no ensaio foram definidas através do ensaio de toxicidade aguda. Através da determinação da CL50%(48h) de $1,40 \text{ mg L}^{-1}$, com limite inferior de 0,96 e superior de $2,10 \text{ mg L}^{-1}$, as concentrações foram determinadas a partir do valor do limite superior, que foi dividido por 5, 10, 50 e 100, determinando o valor das novas concentrações aplicadas no ensaio de $0,042 \text{ mg L}^{-1}$, $0,21 \text{ mg L}^{-1}$, $0,42 \text{ mg L}^{-1}$, $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ e controle.

2.2. Análises hematológicas

Para análises hematológicas, amostras de sangue dos peixes (1 mL), foram coletadas por punção caudal, utilizando-se seringa e agulha heparinizadas. As amostras foram usadas para determinar os seguintes parâmetros: hematócrito (Ht) (técnica do

microhematócrito), teor de hemoglobina (Hb) (método da cianomethemoglobina), contagem de glóbulos vermelhos (RBC) (com câmara Neubauer) e cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio (MCV), concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC) e hemoglobina corpuscular média (HCM) (Ranzani-Paiva et al. 2013).

Imediatamente após a coleta do sangue, foram confeccionadas extensões, posteriormente coradas pelos corantes May-Grünwald-Giemsa (MGG), realizadas as contagens de eritrócitos, leucócitos totais e diferenciais (WBC) e de trombócitos (Tromb) pelo método indireto (Hrubec e Smith, 1998). O teor de proteínas totais no plasma foi determinado usando um refractômetro.

As análises hematológicas foram analisadas em dois momentos: após 7 dias de tratamento e após 21 dias de recuperação.

2.3. Análises histopatológicas

As amostras foram coletadas em dois momentos do experimento, primeiro após 7 dias de exposição e depois após 21 de recuperação foram coletadas amostras de brânquias, cérebro, fígado e rim dos animais sobreviventes. Os órgãos foram retirados, seccionados longitudinalmente e imersos em solução fixadora de formol (10%) por 24 horas.

Após a fixação, os fragmentos passaram por desidratação, diafanização e inclusão em Histosec® (Merck). A seguir, foi realizada a microtomia em micrótomo manual, obtendo-se cortes de 3 a 5µm de espessura, corados com Hematoxilina-Eosina e PAS (ácido periódico de Schiff) (Behmer et al., 1976).

3. Resultados e Discussão

Após 7 dias de exposição diárias ao azametifós e após 21 dias de recuperação os parâmetros hematológicos dos animais não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações avaliadas (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Valores médio desvio (n=30) dos parâmetros sanguíneos (série vermelha) em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*), submetidos às concentrações (mg L⁻¹) de Azametifós e recuperação de 21 dias após aplicação.

Parâmetros	Aplicação de azametifós					DMS	CV	F
	Controle	0,042 mg L ⁻¹	0,21 mg L ⁻¹	0,42 mg L ⁻¹	0,84 mg L ⁻¹			
Eritrócitos (x 10⁶/μL)	262,00 a	226,00 a	261,66 a	236,91 a	261,25 a	151,66	35,83	0,22 ^{NS}
Hematócrito (%)	27,61 a	26,60 a	28,95 a	29,80 a	29,63 a	4,08	8,44	1,96 ^{NS}
Hemoglobina (g/dL)	7,06 a	6,20 a	7,22 a	7,28 a	6,54 a	2,52	21,71	0,60 ^{NS}
Proteína Total	3,03 a	2,88 a	3,21 a	3,06 a	2,91 a	0,84	16,43	0,43 ^{NS}
CHCM (g/dL)	25,46 a	23,34 a	25,26 a	24,49 a	21,78 a	8,34	20,43	0,58 ^{NS}
HCM (pg)	0,000027 a	0,000038 a	0,000031 a	0,000040 a	0,000025 a	0,0000	64,42	0,61 ^{NS}
VCM (fL)	0,010 a	0,015 a	0,013 a	0,018 a	0,012 a	0,018	75,74	0,49 ^{NS}
Recuperação								
Eritrócitos (x 10⁶/μL)	246,83 a	232,25 a	243,91 a	198,08 a	144,08 a	159,45	44,14	1,26 ^{NS}
Hematócrito (%)	30,21 a	28,30 a	23,18 a	32,13 a	24,88 a	10,89	23,16	1,98 ^{NS}
Hemoglobina (g/dL)	7,09 a	7,60 a	8,17 a	8,02 a	6,67 a	3,33	26,16	0,62 ^{NS}
Proteína Total	2,73 a	2,68 a	2,95 a	3,16 a	2,85 a	1,33	27,46	0,36 ^{NS}
CHCM (g/dL)	23,58 b	26,59 ab	36,00 a	24,97 ab	22,31 b	12,15	26,85	3,46*
HCM (pg)	0,000032 a	0,000036 a	0,000046 a	0,000048 a	0,000048 a	0,0000	66,42	0,41 ^{NS}
VCM (fL)	0,013 a	0,014 a	0,014 a	0,019 a	0,018 a	0,017	64,14	0,44 ^{NS}

MCV: volume corpuscular médio, MCH: hemoglobina corpuscular média, MCHC: hemoglobina corpuscular média concentração; CV: Coeficiente de variação.

Tabela 10. Valores médio desvio (n=30) dos parâmetros sanguíneos (série branca) em juvenis de tambaqui (*C. macropomum*), submetidos às concentrações (mg L⁻¹) de Azametifós e recuperação de 21 dias após aplicação.

Parâmetros	Aplicação de azametifós					DMS (5%)	CV	F
	Controle	0,042 mg L ⁻¹	0,21 mg L ⁻¹	0,42 mg L ⁻¹	0,84 mg L ⁻¹			
Linfócito	94956,4 a	87907,4 a	106351,6 a	107391,4 a	85164,6 a	82733,7	50,63	0,26 ^{NS}
Monócito	57359,6 a	59890,6 a	54978,3 a	56883,1 a	64515,1 a	42821,9	43,00	0,13 ^{NS}
Neutrófilo	14788,8 a	13017,6 a	24580,3 a	20608,1 a	31437,8 a	28728,8	81,11	1,17 ^{NS}
Eosinófilo	94854,3 a	65184,1 a	75423,1 a	163761,5 a	80132,3 a	224739,0	138,25	0,53 ^{NS}
Trombócitos	654918,3 a	565000,0 a	653833,3 a	592291,6 a	653125,0 a	379400,7	35,86	0,22 ^{NS}
Recuperação								
Linfócito	135993,4 a	101612,0 a	113640,3 a	100842,9 a	65854,0 a	86684,6	49,35	1,48 ^{NS}
Monócito	66576,0 a	55822,3 a	46417,8 a	60335,8 a	37177,0 a	48499,7	53,69	0,99 ^{NS}
Neutrófilo	13839,0 a	11971,0 a	15345,5 a	10738,8 a	11245,6 a	13743,9	64,18	0,34 ^{NS}
Eosinófilo	50805,5 a	5954,0 a	61110,5 a	33501,0 a	19859,5 a	42514,1	55,76	3,03*
Trombócitos	637464,1 a	577325,5 a	602389,5 a	502544,1 a	351520,0 a	398891,0	44,03	1,40 ^{NS}

CV: Coeficiente de variação.

As análises hematológicas após 7 dias de aplicação do azametifós, tanto para a série vermelha para a série branca não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Para as análises de recuperação (21 dias sem aplicação do azametifós) para a série vermelha apenas a análise de CHCM apresentou diferença significativa, na concentração $0,021 \text{ mg L}^{-1}$ com $36,00 \text{ g/dL}$. Semelhante aos valores de CHCM foram significativamente maiores no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com toltrazuril e enrofloxacin, segundo Carraschi et al., 2016. O aumento de MCHC em peixes tratados (Florfenicol + thiamethoxam) indicam hemólise, de acordo com Thrall et al. (2006).

As análises histopatológicas demonstram que o fígado dos tambaquis do controle apresenta organização cordonal dos hepatócitos e capilares sinusóides que se formam a partir das veias centrais. Os hepatócitos apresentam formato hexagonal levemente arredondado, com citoplasma claro, núcleo pouco basófilo e nucléolo evidente. Na avaliação da reação de ácido periódico de Schiff foi detectado a presença de grânulos de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos. Demonstrando as mesmas características descritas por Carraschi et al. (2016) para o pacu.

Após 7 dias de exposição, as concentrações de $0,042$; $0,21$ e $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ ocorreu hipertrofia dos hepatócitos e aumento do diâmetro dos capilares sinusóides. Similar a hipertrofia dos hepatócitos descrita por Carraschi et al., (2016) em pacu após tratamento com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ toltrazuril, cinco dias, e a $90,0 \text{ mg L}^{-1}$ enrofloxacin, 7 dias. Na concentração $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ foi observado desarranjo na estrutura cordonal dos hepatócitos.

Após os 21 dias de recuperação, com $0,042 \text{ mg L}^{-1}$, a estrutura histológica do fígado foi similar à do controle, porém permaneceu o aumento do volume celular (hipertrofia) e aumento do diâmetro do capilar sinusóide. Em $0,21 \text{ mg L}^{-1}$, $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,84 \text{ mg L}^{-1}$, os hepatócitos ainda apresentaram hipertrofia e desarranjo na organização cordonal dos hepatócitos. Diferindo dos dados de Ignácio (2018) que observaram total recuperação do fígado após 30 dias de recuperação da exposição ao inseticida fipronil



Figura 2. A. Fígado controle de tambaqui. B. Concentração $0,042 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, ocorreu hipertrofia dos hepatócitos e aumento do diâmetro dos capilares sinusóides. C. Concentração $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, desarranjo na estrutura cordonal dos hepatócitos.

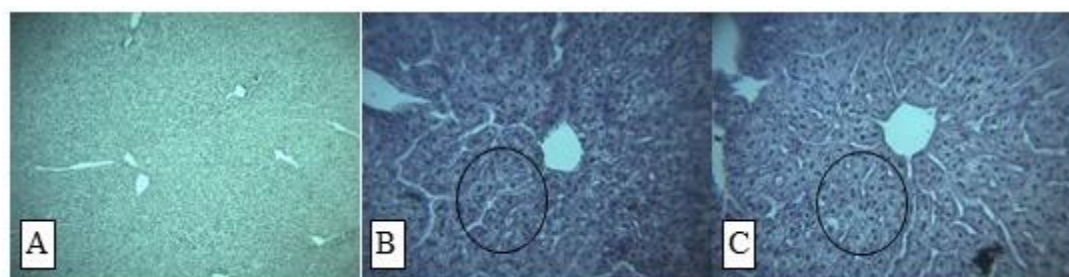


Figura 3. A. Fígado controle de tambaqui. B. Concentração $0,042 \text{ mg L}^{-1}$ após 21 dias de recuperação sem aplicação de azametifós, permaneceu o aumento do volume celular (hipertrofia) em algumas regiões e aumento do diâmetro do capilar sinusóide. C. Concentração $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ após 21 dias de recuperação sem aplicação de azametifós, os hepatócitos ainda apresentaram hipertrofia e desarranjo na organização cordonal.

O tecido renal do tambaqui (*C. macropomum*) apresentaram as mesmas características sete dias após exposição e 21 dias após recuperação. Os glomérulos são compostos por vasos sanguíneos aferentes e eferentes anastomosados. Os túbulos contorcidos proximais são irregulares e são revestidos por um epitélio cúbico simples ciliados. Os túbulos contorcidos distais são arredondados e possuem o mesmo tipo epitelial. No estroma renal ocorre a presença do tecido hematopoiético. As concentrações $0,042 \text{ mg L}^{-1}$; $0,21 \text{ mg L}^{-1}$ são similares ao controle (Figura 4).

A mesma descrição foi realizada por Carraschi et al., (2016) sobre o rim do pacu. Após sete dias de exposição, os peixes expostos a $0,21$ e $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ apresentaram desprendimentos dos glomérulos das cápsulas glomerulares e aumento entre as células dos túbulos contorcidos proximais e em $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ a estrutura glomerular apresentou desprendimento da cápsula e desarranjo da cápsula

glomerular. Essas alterações diferem de pacu após tratamento com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ toltrazuril, $90,0 \text{ mg L}^{-1}$ enrofloxacin, antibiótico, por 5 e 7 dias, em que as características histológicas demonstraram semelhantes aos do controle.

Após os 21 dias de recuperação, com $0,042 \text{ mg L}^{-1}$, foi similar ao controle. Na concentração $0,042 \text{ mg L}^{-1}$, $0,21$ e $0,42 \text{ mg L}^{-1}$, ocorreu desprendimento dos glomérulos da capsula glomerular. Em $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ apresentou aumento do espaçamento entre as células do túbulo proximal. Esses dados diferem de Ignácio (2018) que observaram pontos de vacuolização celular em rins de pacu após 30 dias de recuperação após exposição de $0,64 \text{ mg L}^{-1}$ de fipronil.

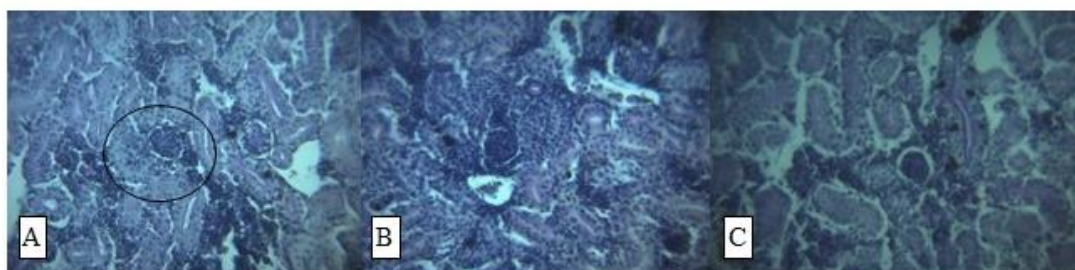


Figura 4. A. Rim controle de tambaqui, presença de glomérulos. B. Concentração $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, similar ao controle, presença de glomérulos. C. Concentração $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ de azametifós, ocorreu desprendimentos dos glomérulos das capsulas glomerulares e aumento entre as células dos túbulos contorcidos proximais.

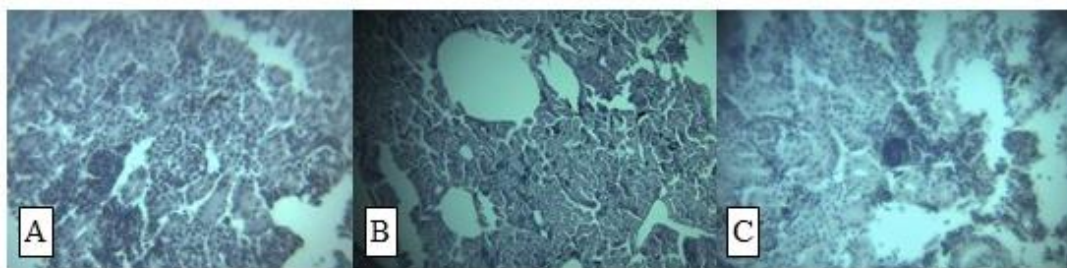


Figura 5. A. Rim controle de tambaqui, presença de glomérulos. B. Concentração $0,21 \text{ mg L}^{-1}$ após 21 dias de recuperação sem aplicação do azametifós, foram similares ao controle e em algumas regiões ocorreram desprendimento dos glomérulos da capsula glomerular. C. Concentração $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ após 21 dias de recuperação sem aplicação do azametifós, aumento do espaçamento entre as células do túbulo contorcido proximal.

A brânquia do tambaqui (*C. macropomum*) é constituída por lamela primária formada por tecido cartilaginoso e tecido conjuntivo revestido por epitélio mucoso de revestimento. Da lamela primária partem as lamelas secundárias formadas por tecido

conjuntivo de sustentação, revestido por células mucosas, células de sustentação (pilares) e células cloreto. Essa descrição histológica é semelhante ao analisado por Carraschi et al., (2016) em pacu.

Após 7 dias de exposição, na concentração 0,042 mg L⁻¹ ocorreu estase sanguínea no interior da lamela secundária. Nas concentrações 0,21; 0,42 e 0,84 mg L⁻¹ ocorreu desarranjo da estrutura de sustentação da lamela secundária. Diferindo ao que foi apresentado por Guimarães et al. (2007), que expôs tilápias (*Oreochromis niloticus*) ao produto organofosforado triclorfon com concentração única de 0,25 ppm e os organismos expostos apresentaram edema e congestão sanguínea próximos as lamelas primárias.

Após 21 dias de recuperação nas concentrações 0,042 e 0,21 mg L⁻¹, apresentaram similaridade ao controle, mostrando total recuperação das estruturas branquiais. Na concentração 0,42 mg L⁻¹ ocorreu estase sanguínea na lamela secundária e desarranjo da estrutura de sustentação. Em 0,84 mg L⁻¹ ocorreu desarranjo da estrutura de sustentação da lamela secundária, mas a estrutura tecidual apresentou recuperação após 21 dias sem aplicação do produto azametifós. Semelhante ao apresentado por Ignácio (2018) as amostras de pacu coletadas no 30º dia de recuperação inseticida fipronil na concentração 0,64 mg L⁻¹, as brânquias se apresentaram totalmente recuperadas.

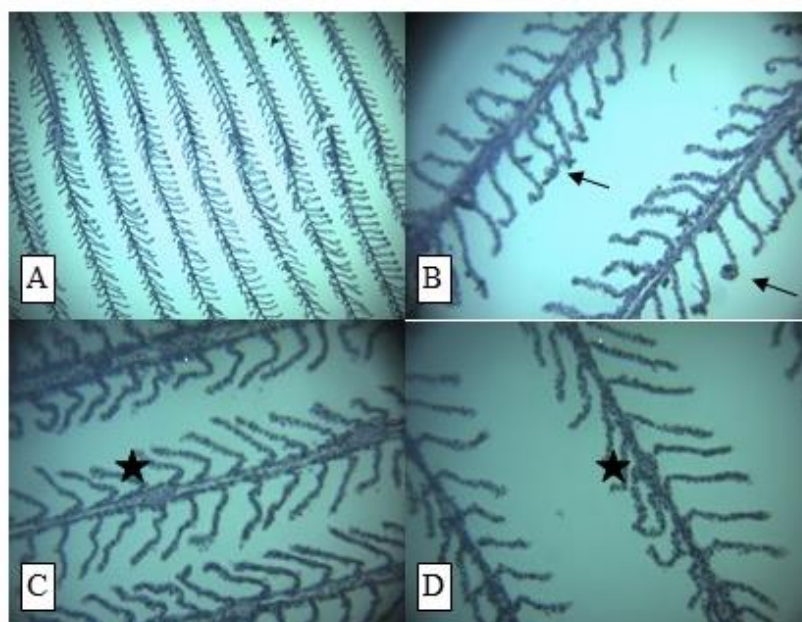


Figura 6. A. Brânquia controle de tambaqui. B. Concentração 0,042 mg L⁻¹ de azametifós, ocorreu estase sanguínea no interior da lamela secundária e desarranjo leve da estrutura de sustentação da lamela secundária. C. Concentração 0,21 mg L⁻¹ de azametifós, ocorreu estase sanguínea no interior da lamela secundária e desarranjo leve da estrutura de sustentação da lamela secundária. D. Concentração 0,42 mg L⁻¹ de azametifós, ocorreu estase sanguínea no interior da lamela secundária e desarranjo leve da estrutura de sustentação da lamela secundária

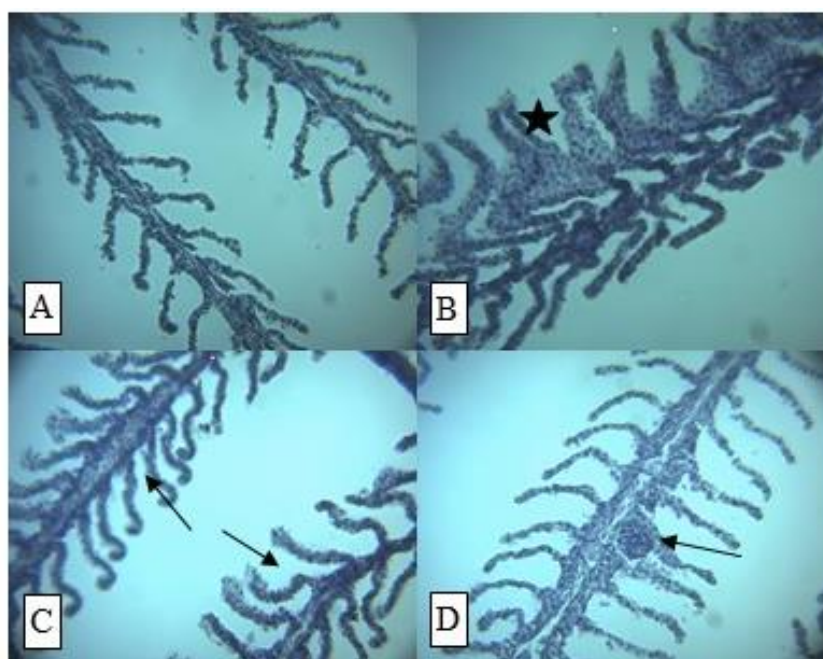


Figura 7. A. Brânquia controle de tambaqui. B e C. Concentração 0,42 mg L⁻¹ de recuperação após 21 sem aplicação do azametifós, ocorreu um acúmulo de sangue na lamela secundária em algumas regiões, com desarranjo da estrutura de sustentação. D. Concentração

0,84 mg L⁻¹, ocorreu desarranjo da estrutura de sustentação da lamela secundária, mas a estrutura tecidual apresentou recuperação após aplicação do produto azametifós.

O tecido nervoso central controle do tabaqui (*C. macropomum*) é formado por neurônios e células da glia. Os neurônios ocupam determinadas regiões do encéfalo (SNV) e a região de córtex cerebelar é formada por duas camadas: molecular e granulosa, no limite entre as duas camadas ocorre a presença de células de Purkenji. A camada granulosa é formada por pequenos corpos de neurônios. Os espaços claros entre as células granulosas é o local onde ocorre as sinapses celulares. Na camada molecular estão visíveis corpos dos neurônios, os axônios e as sinapses, além das células de glia. Na região do mesencéfalo abaixo da camada granulosa, é possível observar a região endimária, composta por células endimares que reveste os ventrículos do cérebro. Este epitélio de revestimento simples é formado por células cúbicas ciliadas (Figura 8).

Após os 7 dias de tratamentos de azametifós na concentração 0,042 mg L⁻¹ a estrutura foi similar ao controle, com leve estase sanguínea na camada molecular. Nas concentrações 0,21; 0,42 e 0,84 mg L⁻¹ ocorreu estase sanguínea na camada molecular e na camada granulosa.

Após 21 dias de recuperação em todas as concentrações 0,042; 0,21; 0,42 e 0,84 mg L⁻¹ apresentaram recuperação sendo todas similares ao controle.



Figura 8. A. Cérebro controle de tabaqui – Camadas: molecular (M) e granulosa (G). B. Cérebro, concentração 0,042 mg L⁻¹ de azametifós, estrutura foi similar ao controle, com leve estase sanguínea na camada molecular. C. Cérebro, concentração 0,21 mg L⁻¹ de azametifós, ocorreu estase sanguínea na camada molecular e na camada granulosa.

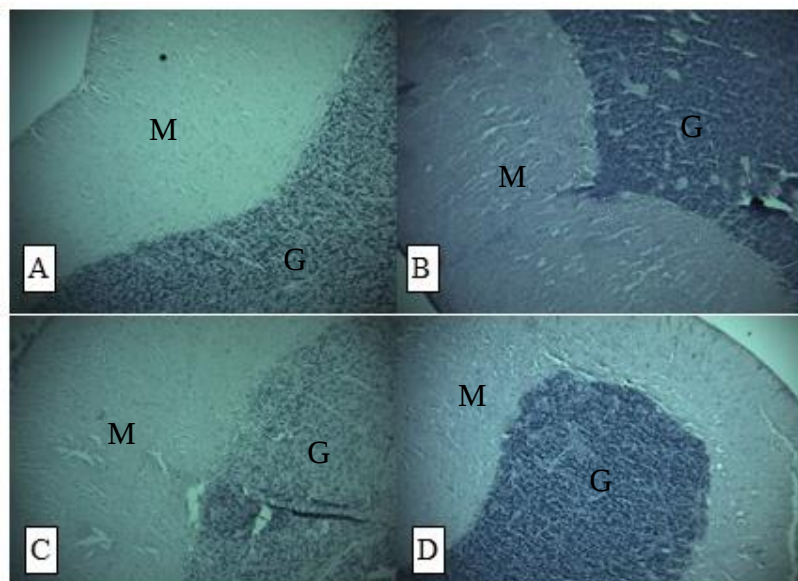


Figura 9. A. Cérebro controle de tambaqui – Camadas: molecular (M) e granulosa (G). B. Concentração $0,21 \text{ mg L}^{-1}$ após 21 dias de recuperação sem aplicação do azametifós, apresentaram eficiência na recuperação dos organismos. C. Concentração $0,42 \text{ mg L}^{-1}$ após 21 dias de recuperação sem aplicação do azametifós, apresentaram eficiência na recuperação dos organismos. D. Concentração $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ após 21 dias de recuperação sem aplicação do azametifós, apresentaram eficiência na recuperação dos organismos.

4. Conclusão

Assim, o ensaio de simulação de tratamento com o azametifós causa alterações histopatológicas transitórias, com recuperação após 21 dias sem aplicação, nos tecidos branquiais, nervoso, hepático, renal e sanguíneo.

Conclusão Geral

A toxicidade relativa do azametifós indica efeito muito tóxico para os bioindicadores caramujo, zebrafish e para o tambaqui (*C. macropomum*). Em exposição crônica e na simulação de tratamento ao inseticida apresentou efeito subletal com alterações histopatológicas transitórias nos principais tecidos do peixe, porém com recuperação após 21 dias sem aplicação, nos tecidos branquiais, nervoso, hepático, renal e do sangue, não causando alterações hematológicas significativas, sem causar danos ao tambaqui.

5. Referências

- Aaen, S.M.; Helgesen, K.O.; Bakke, M.J.; Kaur, K.; Horsberg, TE. Drug resistance in sea lice: a threat to salmonid aquaculture. *Trends Parasitol.* v.31, p.72-81. 2015.
- Abdelkhalek NKM, Ghazy EW, Abdel-Daim MM. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. *Environ Sci Pollut Res* v. 22, p. 3023–3031, 2015.
- Adhikari, N. P.; Pehg, X.; Alizadeh, A.; Ganti, S.; Nayak, S. K.; Kumar, S. K. Multiscale modeling of the surfactant mediated synthesis and supramolecular assembly of cobalt nanodots. *Physical Review Letters*, 93:18301- 18304. 2004.
- Bacchetta C, Rossi A, Ale A, Campana M, Parma MJ, Cazenave J. Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach. *Ecol Indic.* v. 36, p.532–538, 2014.
- Behmer, A. O., Tolosa, E. M. C., & Freitas-Neto, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica (239p). São Paulo: Edart. 1976.
- Bernet DH, Schmidt W, Meier P, Burkhardt-HoI M, Wahi TI. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* v.22, p.25–34, 1999.
- Braz-Mota, S.; Sadauskas-Henrique, H.; Duarte, R. M.; Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, v. 135, p. 53–60, 2015.
- Burridge L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K. Use of chemicals in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquicultura*, v.306, p. 7–23, 2010.
- Canello Schalch, S. H.; De Andrade Belo, M. A.; Soares, V. E.; Rodini Engrácia De Moraes, J.; Ruas De Moraes, F. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 27(2). 2005.
- Carraschi, S.P.; Florêncio, T.; Ignácio, N.F.; Ikefuti, C.V.; Cruz, C.; Ranzani-Paiva, M.J.T. Hematological and histopathological assessment of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after treatment of pathogens with veterinary medicinal products. *Comp Clin Pathol*, 2016.
- Casida, J. E.; Durkin, K.A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. In: Berenbaum, M. R (Ed.), *Annu Ver Entomol.* v. 58, p. 99-117, 2013.

Castro, J. da S., Sodré, C. F. L., Souza, C. B., Sousa, D. B. P., Neta, R. N. F. C. Histopathological and hematological biomarkers in tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) from an environmental protection area of Maranhão, Brazil. *Rev. Ambient.* 14, (1), e2266, 2019.

Da Rocha, A. S. Toxicidade aguda e subaguda do triclorfon em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1836). (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Tocantins). 2009.

Dores, E. F. G. C.; De-Lamonica-Freire, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do Leste, Mato Grosso – análise preliminar. *Quim. Nova*, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

Dorucu, M., Colak, S. O., Ispir, U., Altinterim, B., Celayir, Y. The Effect of Black Cumin Seeds, *Nigella sativa*, on the Immune Response of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mediterranean Aquaculture Journal*. v.2, p.27-33, 2009.

Ferri, G. H. Avaliação do potencial de *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotidae) como bioindicador no monitoramento do Masoten®. Tese de mestrado. UNICAMP – Campinas, SP. 2019.

Figueiredo-Fernandes A, Ferreira-Cardoso JV, Garcia-Santos S, Monteiro SM. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesq Veter Bras* v. 27, n.3, p.103–109, 2007.

Gabriel UU, Amakiriand EU, Ezeri GNOHaematology and gill pathology of *Clarias gariepinus* exposed to refined petroleum oil, kerosene under laboratory conditions. *J Anim Veterin Adv* v. 6, n. 3, p. 461–465, 2007.

Ghaffar A, Ashraf S, Hussain R, Hussain T, Shafique M, Noreen S, Aslam S. Clinico-hematological disparities induced by triazophos (organophosphate) in Japanese quail. *Pak Veterin J* v. 34, n.2, p.257–259, 2014.

Guimarães, A. T. B., Silva De Assis, H. C., & Boeger, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.68, p.57–62, 2007.

Hrubec, T.C.; Smith, S. Haematology of fish. In: Schalm's veterinary haematology, 5a edn, pp. 1120–1125, 1998.

Ignácio, N.F. Recuperação de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) sobreviventes à intoxicação aguda por fipronil. Tese de doutorado, Caunesp, 2018.

Marigoudar SR, Ahmed RZ, David M. Ultrastructural responses and oxidative stress induced by cypermethrin in the liver of *Labeo rohita*. *Chem Ecol.* v. 29, p. 296–308, 2013.

Mataqueiro, M. I. Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). 2002

- Matsuo, A. Y. O.; Wood, C. M.; Val, A. L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology*, v. 74, p. 351–364, 2005.
- Mayer, F. L.; Versteeg, D. J.; Mckee, M. J.; Folmar, L. C.; Graney, R. L.; Mccume, D. C.; Rattner, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett, R. J.; Kimerli, R. A.; Mehrle, P. M.; Bergman, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, cap. 4, p. 155 –196.1992.
- Mohebbi, A., Nematollahi, A., Ebrahimi Dorcheh, E., & Goodarzian Asad, F. Influence of dietary garlic (*Allium sativum*) on the antioxidative status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 2011.
- Moon JY, Kim YB, Lee SI, Song H, Choi K, Jeong GH. Distribution characteristic of polychlorinated biphenyls in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) from major rivers in Korea. *Chemosph* v.62, p. 430–439, 2006.
- MPA (2011). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Ministério da Pesca e Aquicultura, p. 60, 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/ultimas-noticias/885-mpa-lanca-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2011>. Acesso em 18/09/2020.
- Ranzani-Paiva M.J.T.; Pádua S.B.; Tavares–Dias M.; Egami M.I. Métodos para análise hematologia de peixes, 1 edn. Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, p. 142, 2013.
- Salazar-Lugo, R. et al. Short communication Histopathological changes in gill , liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomum* exposed to paraquat at different temperatures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 31, n. 3, p. 490–495, 2011.
- Silva, A. S. E.; Lima, J. T.; Blanco, Q. S. Hematologia em peixes (revisão bibliográfica). *Revista Centauro*, v.3. n.1, p24-32. 2012
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F. R. Hematologia de peixes teleósteos. Ed. Eletrônica e Arte Final. Ribeirão Preto-SP. 144 paginas, 2004.
- Thrall, G.; Lane D, Carroll, D.; Lip, G. Quality of life in patients with atrial fibrillation: a systematic review. *The Am J Med*, v.119, n.5, p.448–e1-448.e19, 2006.
- Venturini, F.P., Moraes, F. D., Rossi, P. A., Avilez, I. M., Shiogiri, N. S. Moraes, G. A multi-biomarker approach to lambda-cyhalothrin effects on the freshwater teleost matrinxa *Brycon amazonicus*: single-pulse exposure and recovery. *Fish Physiol Biochem*. v. 45, p. 341-353, 2019.