

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DO FÍGADO EM
PACU *Piaractus mesopotamicus* TRATADOS COM DIFLUBENZURON

André Luiz do Nascimento Silva

Campo Grande – MS

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DO FÍGADO EM
PACU *Piaractus mesopotamicus* TRATADOS COM DIFLUBENZURON**

**Hematological parameters and histological of liver in pacu *Piaractus
mesopotamicus* treated with diflubenzuron**

André Luiz do Nascimento Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção
Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2017

Certificado de aprovação

ANDRÉ LUIZ DO NASCIMENTO SILVA

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E HISTOLÓGICOS DO FÍGADO EM PACU *Piaractus mesopotamicus* TRATADOS COM DIFLUBENZURON

Hematological parameters and histological of liver in pacu *Piaractus mesopotamicus* treated with diflubenzuron

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de mestre em Ciência Animal.

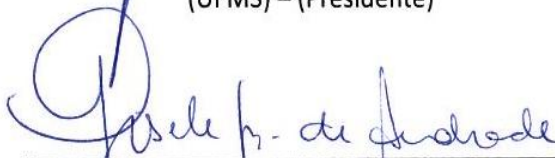
Área de concentração: Produção
Animal.

Aprovado(a) em: 24-02-2017

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
(UFMS) – (Presidente)



Dra. Gisele Braziliano de Andrade
UCDB



Dra. Alda Izabel de Souza
UFMS

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

Aos meus pais, Nelson Seles Silva e Maria Eronita do Nascimento, pelo amor, presença, confiança e dedicação.

Ao meu irmão, Bruno do Nascimento Medeiros, que sempre me apoiou a cada decisão.

A minha namorada, Luana Oliveira de Souza, por todo o amor, companheirismo, confiança e aos meus amigos por todos os momentos compartilhados.

Ao meu orientador, Profº Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes, pela orientação na elaboração desta dissertação, amizade, confiança e pela oportunidade recebida.

A equipe do Laboratório de Patologia Experimental (Lapex) pelo auxílio durante as atividades experimentais.

À UFMS, pela disponibilidade de ensinamentos e lições de vida, que vou levar por toda minha formação profissional.

A banca avaliadora, pelos ensinamentos transmitidos e disponibilidade para avaliação e correção deste trabalho.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/CAPES nº 07/2015 – GM - 59/300.350/2015) pelo suporte financeiro para a realização do estudo.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.” (Jung)

Resumo

SILVA, A. L. N. Parâmetros hematológicos e histológicos do fígado em pacu *Piaractus mesopotamicus* tratados com diflubenzuron. Ano 2017. 44f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

A piscicultura continental brasileira é um dos setores de produção que mais cresce no país, e atrelado a este crescimento, técnicas e manejos são desenvolvidos visando melhorar o desempenho dos animais e valorização do produto final. O emprego de pesticidas vem sendo utilizado no controle de ectoparasitos de peixes, porém o conhecimento sobre os efeitos e ações dos quimioterápicos no organismo e no meio ambiente são escassos. Neste contexto, objetivou-se avaliar o perfil hematológico e alterações histológicas no fígado de *Piaractus mesopotamicus* expostos ao pesticida Diflubenzuron (DFB), na concentração de 70 mg L⁻¹ por meio de banho de imersão, em diferentes períodos. Os *P. mesopotamicus* foram sujeitos a três períodos de exposição: 30, 60 e 120 minutos, com objetivo de verificar o efeito tóxico do produto em cada tratamento. Para avaliação dos parâmetros hematológicos foi realizado eritrograma, leucograma e cálculos dos índices hematimétricos, e os achados histológicos foram classificados conforme a gravidade e a intensidade das lesões. Os exemplares expostos por 30 minutos apresentaram redução na hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média e foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) no número de leucócitos totais em pacus expostos por 60 minutos ao diflubenzuron, quando comparados ao grupo controle. O estudo histológico revelou alterações no tecido hepático dos animais expostos ao DFB. Após os ensaios os peixes apresentaram alterações regressivas, circulatório e inflamatório, como vacuolização dos hepatócitos, degeneração hidrópica difusa, presença de infiltrado inflamatório, congestão e núcleos picnóticos em algumas amostras. Os resultados indicaram que o xenobiótico é pouco tóxico para a espécie, mesmo com alterações nos parâmetros hematológicos e no tecido hepático após exposição aguda ao diflubenzuron.

Palavras - chave: Efeitos tóxicos, toxicologia, xenobióticos.

Abstract

SILVA, A. L. N. Hematological parameters and histological of liver in pacu *Piaractus mesopotamicus* treated with diflubenzuron. Ano 2017. 44f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

The brazilian continental fish farming is one of the fastest growing productive sector in the country, and coupled to this growth, and management techniques are developed to improve the performance of fishes and value of the final product. The application of pesticides has been used in the control of ectoparasites of fish, however the knowledge about the effects and actions of chemotherapeutic drugs in the body and in the environment are scarce. In this context, the objective of this study to evaluate haematological profile and histological changes in the liver of *Piaractus mesopotamicus* exposed to the pesticide Diflubenzuron (DFB), in concentration of 70 mg L⁻¹ through bath, in different periods. The *P. mesopotamicus* were subject three periods of exposure: 30, 60 and 120 minutes, in order to check the toxic effect of the product on each treatment. For evaluation of hematologic parameters was performed erythrogram, white bloods cells (WBC) and calculations of hematimetric parameters, and the histological findings were classified according to the severity and intensity of the lesions. The specimens exposed for 30 minutes showed reduction in hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration, and it was observed significant increase ($P<0,05$) in the number of total leukocytes in pacus exposed for 60 minutes of diflubenzuron, when compared to the control group. The histological study revealed severe changes in the liver tissue of animals exposed to the DFB. After the tests the fish showed regressive, circulatory and inflammatory changes, as vacuolization of hepatocytes, hydropic degeneration diffuse, presence of focal inflammatory infiltrate, congestion and picnotic nuclei in some samples. The results indicate that the xenobiotic is not very toxic to the species, even with changes in the hematological parameters and in the hepatic tissue after acute exposure to diflubenzuron.

Keywords: Toxic effects, toxicology, xenobiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) 11

Figura 2. Fórmula química do composto Diflubenzuron ($C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$) 16

Artigo Científico. Parâmetros Hematológicos e Histologia do Fígado de Pacu *Piaractus mesopotamicus* Expostos ao Diflubenzuron.

Figura 1. Secções histológicas do fígado de *Piaractus mesopotamicus* expostos ao diflubenzuron (70 mg L^{-1}). Coloração, H&E 8

Figura 2. Índice esplenossomático (IES), índice hepatossomático (IHS) e índice de lesão do órgão (Iorg) calculados para o fígado de *P. mesopotamicus* expostos ao DFB (70 mg L^{-1}) de acordo com o tempo de exposição. Valores seguidos por asterisco diferem entre Controle e tempo de exposição ($P<0.05$). 9

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico. Parâmetros Hematológicos e Histologia do Fígado de Pacu *Piaractus mesopotamicus* Expostos ao Diflubenzuron.

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ d.p.) do eritrograma de pacus (*P. mesopotamicus*) expostos ao Diflubenzuron (70 mg L^{-1}) de acordo com o tempo de exposição..... 7

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ d.p.) do leucograma, leucócitos e trombócitos totais de pacus (*P. mesopotamicus*) expostos ao Diflubenzuron (70 mg L^{-1}) de acordo com o tempo de exposição 7

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2. 1. Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	11
2. 1. 1. Pacu como bioindicadores.....	12
2. 2. Agrotóxicos na Piscicultura.....	13
2. 3. Diflubenzuron	16
2. 4. Teste de Toxicidade	19
2. 5. Biomarcador Hematológico.....	20
2. 6. Biomarcador Histológico	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
4. Parâmetros Hematológicos e Histologia do Fígado de Pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> Expostos ao Diflubenzuron.....	1
Resumo	1
Introdução.....	2
Material e Métodos	4
Resultados	7
Discussão	9
Conclusão	12
Agradecimentos.....	12
Referências Bibliográficas	13

1. INTRODUÇÃO

O pacu é uma das espécies mais frequentes na produção de peixes continentais, produzido em cerca de 80% dos sistemas de produção comercial em todos os estados brasileiros (LOPES et al. 2006). Entre as espécies tropicais cultivadas, o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) surge como produto de grande potencial para as pisciculturas devido ao fácil manuseio da espécie, a taxa de crescimento satisfatório e a grande aceitação pelo consumidor (JOMORI et al., 2003).

No Brasil não existe regulamentações específicas para uso de inseticidas no tratamento de peixes cultivados, segundo Guimarães et al. (2007) o uso de produtos químicos representa uma alternativa para reduzir os prejuízos econômicos associados a epidemias frequentes nas pisciculturas continentais. Entretanto, as complexidades dos sistemas intensivos dificultam a avaliação dos efeitos causados pelo uso de pesticidas agrícolas, e quando usadas em tratamento de doenças de peixes são um risco para o homem e ao meio ambiente (LOPES et al., 2006; MABILIA et al., 2008).

O diflubenzuron (DFB) pertencente ao grupo químico benzoiluréia, sobre a fórmula de 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea (WEXLER, 2000), consiste em um praguicida derivado da ureia que atua como inibidor de enzimas responsáveis pela ecdise, impedindo a síntese de quitina do exoesqueleto dos artrópodes (MULLA & DARWAZETH, 1979). Mesmo sendo um pesticida agrícola, o diflubenzuron tem sido utilizado no controle de ectoparasitas nas pisciculturas continentais em diversas regiões do país (ESTEVES & ISHIKAWA, 2006; MABÍLIA et al., 2008; LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009). A ausência de padronização ou recomendação de inseticidas na piscicultura contribui para que ocorra o aumento dos níveis do xenobióticos no ambiente, de maneira geral o diflubenzuron pode comprometer a qualidade de água, colocar em risco a saúde dos peixes, crustáceos e insetos presentes na biota aquática (MADUENHO; MENDES & MARTINEZ, 2008; SILVEIRA et al., 2009).

A variação nos efeitos tóxicos dos pesticidas relacionado as concentrações e as espécies tratadas, impulsionam estudos laboratoriais com espécies nativas na busca de maximizar a produção por meio de testes que fornecem condições adequadas e controladas, fundamentais para a regulamentação e classificação quanto ao potencial tóxico do produto químico (BEERLI et al., 2004; HENARES et al., 2007; VELMURUGAN et al., 2007). Neste contexto, apesar da toxicidade do diflubenzuron ser baixa segundo dados da Pesticide Action Network North America (PANNA), vários ensaios laboratoriais demonstraram que o

diflubenzuron é tóxico para os peixes (KREUTZ et al., 2008; MADUENHO & MARTINEZ, 2008; LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009; LANGFORD, 2014). Todavia, alguns estudos testando a eficácia do diflubenzuron no controle parasitário, descrevem efeitos não nocivos em peixes tratados (MABÍLIA & SOUZA, 2006; PELLI et al., 2008; ZAIDI & SOLTANI, 2013).

Foram relatados efeitos cancerígenos em animais que apresentaram resíduos de p-cloroanilina (PCA) no organismo após exposição ao DFB, porem segundo FAO (2001) os resultados são insuficientes para estimar a toxicidade do metabólito. Com isso necessita-se de mais estudos toxicológicos para compreender os efeitos tóxicos do diflubenzuron e a resposta do organismo na presença do contaminante.

O conhecimento da resposta hematológica é imprescindível para que o pesquisador consiga compreender as ações de defesa orgânica animal, e desenvolver estratégias para profilaxia de enfermidades na aquicultura (COSTA et al., 2014). A análise do perfil hematológico associado às respostas histopatológicas são ferramentas úteis e sensíveis para diagnosticar os efeitos tóxicos que afetam os animais, diretamente ou indiretamente, auxiliando na compreensão profunda de uma determinada situação patológica. Em testes toxicológicos, os parâmetros hematológicos podem servir como biomarcadores no monitoramento do bem estar dos peixes, sendo utilizados como ferramenta para o diagnostico de estresse, intoxicação por produtos químicos presentes no ambiente ou à presença de agentes infecciosos (SILVA et al., 2012).

A histologia gera dados sobre lesões em níveis teciduais, considerando o metabolismo normal dos animais e suas respectivas adaptações a diferentes alterações ambientais. Com isso, a escolha dos órgãos que serão avaliados é crucial para a relevância dos dados, sendo recomendados órgãos de contato direto com o produto químico, como as brânquias e órgãos responsáveis pelo metabolismo, biotransformação e excreção de xenobióticos, como o fígado e rim (LINS et al., 2010).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos do tratamento químico utilizando diflubenzuron na concentração de 70 mg L⁻¹ em diferentes tempos de exposição, por meio de banhos de imersão. Foram investigados os efeitos do diflubenzuron sobre as variáveis hematológicas e histológicas do fígado em *P. mesopotamicus* em diferentes tempos de exposição.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O pacu (Figura 1) foi utilizado para este estudo por ser uma das espécies mais frequentes na produção de peixes continentais, produzido em cerca de 80% dos sistemas de produção comercial em todos os estados brasileiros (LOPES et al. 2006). A espécie também se destaca no mercado externo, sendo um dos peixes mais exportados da aquicultura continental no Brasil, com os Estados Unidos, Tailândia, Espanha, Coreia do Sul e China sendo seus principais destinos (SEBRAE, 2015).

É uma espécie de Characidae de interesse aquícola, onívoro, reofílico e que apresenta técnicas de cultivo consolidados para produção regional (INOUE et al., 2003). Sua alimentação baseia-se em frutas, crustáceos, insetos e zooplâncton, com maturidade sexual de 3 a 4 anos, fácil adaptação a rações artificiais e tolerância a oxigênio dissolvido a 4,0 mg L⁻¹ e pH entre 6 e 7 (BEERLI & LOGATO, 1999).



Figura 1. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fonte: <http://gopantanal.com.br/img/peixe/pacu.jpg>

O Pacu surge como produto de grande potencial para as pisciculturas devido ao fácil manuseio da espécie, a taxa de crescimento satisfatório, a grande aceitação pelo consumidor e alto valor comercial (JOMORI et al., 2003; URBINATI & GONÇALVEZ, 2005). É uma das espécies mais estudadas no Brasil, adaptados a águas tropicais, encontrados principalmente na bacia do Prata e cultivados principalmente nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (OSTRENSKY et al. 2008).

Possui corpo acinzentado, pigmentação mais escura na região dorsal, clareando em direção ventral, nadadeiras peitorais e dorsais escuras nas bordas, nadadeiras pélvicas, anal e

caudal às vezes alaranjada ou esbranquiçada, dependendo da fase da vida. Apresenta boca terminal com duas fileiras de dentição própria para mastigar e triturar, escamas pequenas, cabeça relativamente pequena e corpo alto com formato orbicular (BAUMGARTNER et al. 2012).

As células de defesa orgânica identificadas e caracterizadas por Tavares-Dias et al. (1999) foram linfócitos, neutrófilos, monócitos, trombócitos e células granulocíticas especiais (CGE). Os mesmos autores observaram linfócitos, neutrófilos e monócitos como células mais frequentes no leucograma, distribuídas nas lâminas sanguíneas de *P. mesopotamicus*. Para a espécie, os parâmetros hematológicos apresentaram correlação para os valores da série vermelha, os eritrócitos apresentaram correlação positiva com a taxa de hemoglobina (Hb), e correlação negativa com volume corpuscular média (VCM). O hematócrito (Htc) foi negativamente correlacionado com a concentração de hemoglobina corpuscular médio (CHCM), assim como VCM, apresentou correlação negativa com o CHCM (TAVARES-DIAS et al., 1999).

2.1.1. Pacu como bioindicador

Os peixes são considerados excelentes bioindicadores, devido a sua sensibilidade a mudanças físicas e químicas da água. São animais realizam a troca gasosa através das brânquias necessitando de constante fluxo de água durante o dia, e o contato direto com a água do meio surge como porta de entrada para xenobióticos e parasitos, devido a esse mecanismo os peixes tornam mais susceptíveis a agentes químicos e patogênicos.

A utilização de peixes como bioindicadores é preconizada durante avaliação da toxicidade de diversos poluentes, Abdel-Khalek et al. (2016) registrou degeneração celular, necrose, presença de infiltrados de células sanguíneas no fígado, fusão lamelar, hiperplasia, necrose, congestão nas brânquias e hiperplasia glomerular, degeneração celular e expansão do espaço de Bowman nos rins de peixes expostos a um ambiente contaminado.

Em caso de contaminação em ambientes aquáticos, os testes de toxicidade da maioria dos produtos químicos foram realizados com invertebrados ou peixes de clima temperado, como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sendo registrados poucos dados sobre os efeitos dos contaminantes em espécies nativas brasileiras, bastante cultivadas e valorizadas no mercado (MOURA et al., 2008). Segundo Rodrigues et al. (2010) os peixes no topo da cadeia

alimentar são amplamente utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental em ecossistemas aquático. Neste contexto, considera-se importante a utilização de espécies de produção como o *P. mesopotamicus* em estudos toxicológicos, testando os efeitos dos produtos químicos e tratamentos convencionais administrados rotineiramente em pisciculturas comerciais.

Para a padronização e identificação do pacu como excelente bioindicador ambiental, os exemplares testados devem apresentar respostas bem caracterizadas que levem em conta a farmacodinâmica, as propriedades físico-químicas do organismo e o agente patológico estudado, respectivamente, assim como sua eficiência e possíveis efeitos negativos ocasionados pela alteração do meio ambiente (NASCIMENTO et al., 2006).

2. 2. Agrotóxicos na Piscicultura

O uso de sistemas intensivos na aquicultura continental tem impulsionado a busca por novas tecnologias e alternativas que aumentem a receita do produtor. Essa constante procura e necessidade de novas tecnologias pode, consequentemente, mascarar os impactos negativos causados por essas inovações (PORTO & SOARES, 2012).

No Brasil não existe regulamentações específicas para uso de inseticidas no tratamento de peixes cultivados, segundo Guimarães et al. (2007) o uso de produtos químicos representa uma alternativa para reduzir os prejuízos econômicos associados a epidemias. Alguns pesticidas são aplicados diretamente em corpos d' água para o controle de pragas e vetores. Além dos tratamentos realizados nas pisciculturas, o fornecimento de água através dos rios próximo a áreas agrícolas e industriais torna a criação de peixe mais susceptível à contaminação (VELMURUGAN et al. 2007; MOSTAKIM et al. 2015).

As informações relativas ao destino de produtos químicos empregados nas pisciculturas são escassas. O descarte inadequado de resíduos de agrotóxicos é uma preocupação constante em relação à atividade agrícola, pois contribui para a contaminação das águas superficiais e subterrâneas (RANGEL et al., 2011). O uso de pesticidas não regulamentados para o controle de parasitos e a comercialização de peixes cultivados sem inspeção surge também como potencial risco de segurança alimentar (LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009).

Os peixes parasitados, que apresentam sintomas como perda do equilíbrio, natação errática, lesões e hemorragias no corpo, dificilmente se recuperam após tratamentos químicos. Neste contexto, procedimentos profiláticos deve ser prioridade, visto que a administração de pesticidas podem gerar consequências para o peixe, meio ambiente e a saúde do consumidor (MARTINS, 2004).

Os xenobióticos são compostos químicos sintéticos presentes em pesticidas, inseticidas e agrotóxicos, que em excesso ou exposição por período prolongado, podem ser tóxicos e ocasionar efeitos danosos aos seres vivos. Dependendo de sua concentração, os agrotóxicos podem ser absorvidos pelos peixes, através da exposição à água ou alimentos contaminados e deposita-los na carcaça (MOURA et al., 2008). O mesmo autor afirma que a capacidade de bioacumulação interligada ao consumo de peixes contaminados e o uso indiscriminado de agrotóxico pelo homem, pode ser caracterizado como mais um problema de saúde pública.

Os agrotóxicos ao cumprirem seu papel de proteger as culturas agrícolas das pragas, doenças e plantas daninhas, podem gerar também respostas adversas a organismos não alvos. O uso frequente e de forma inadequada de agrotóxicos oferecem riscos de contaminação nos solos agrícolas, dos corpos d'água e dos alimentos, consequentemente, efeitos negativos em organismos terrestres, aquáticos e intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados (SPADOTTO et al., 2004).

Em vista as possíveis respostas causadas pela utilização indiscriminada de inseticidas agrícolas, é preciso criar manejos que minimizem seus efeitos indesejáveis (RANGEL et al., 2011). Nenhuma substância química é totalmente segura ou totalmente danosa, seu efeito está relacionado com a sua concentração no meio e seu tempo de permanência ou tempo de exposição sobre o organismo (MONTANHA & PIMPÃO, 2012). O Brasil necessita de novas medidas regulatórias para o uso de agrotóxicos e iniciativas que avaliem os riscos ambientais, medida fundamental para alcançar sustentabilidade no meio rural (GOMES & BARIZON, 2014).

O Brasil se destaca no cenário mundial de consumo de agrotóxico. Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), em 2008 o mercado de agrotóxico movimentou mais do dobro em relação ao ano de 2003, hoje se tornou o maior consumidor de agrotóxico no mundo, representando 86% do consumo total na América Latina (IBGE, 2010). Os agrotóxicos apresentaram diversas mudanças em sua composição conforme o passar dos

anos. Originalmente, os compostos eram estáticos, possuíam baixa solubilidade e tinham um forte poder de adesão ao solo. Na busca por inovações tecnológicas e eficiência na produção agrícola, os produtos passaram a ser mais solúvel em água, mais volátil e apresentar baixa capacidade de adesão (VEIGA et al., 2006). Os mesmos autores citam que esses avanços tecnológicos criaram pesticidas cada vez mais tóxicos, persistentes e eficientes para combater as pragas, entretanto, as novas características químicas dos pesticidas aumentaram e prolongaram seu potencial nocivo no meio ambiente.

Neste cenário, a preocupação dos profissionais da saúde pública com contaminação dos sistemas hídricos por xenobióticos tornou-se crescente. E devido ao consumo de agrotóxicos, houve a formação de uma consciência científica sobre as possíveis consequências do uso indiscriminado de praguicidas, levantando a hipótese de que a utilização de agrotóxicos, em certos casos, podem gerar impactos à saúde humana e ao meio ambiente, maiores do que os benefícios associados aos seus ganhos de produtividade (TOMITA & BEYRUTH, 2002).

A visibilidade dos impactos gerados por agentes químicos é importante para a viabilização das políticas públicas que fomentem a produção sustentável, o consumo consciente e saudável de alimentos dentro dos princípios da legalidade e preservação ambiental (PORTO & SOARES, 2012).

O comportamento dos agrotóxicos no meio ambiente, após sua utilização, é determinado por diferentes processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Entre esses processos, são conhecidos a retenção, transformação e o transporte, definindo por interação desses processos o destino ambiental dos agrotóxicos e sua persistência no meio ambiente (SPADOTTO et al., 2004). A interação entre esses processos também indica a capacidade de acúmulo dos compostos químicos nos órgãos, alguns produtos químicos podem ser encontrados apenas em níveis baixos em vários tecidos, enquanto outros podem acumular concentrações significativas (SPACIE & HAMELINK, 1985).

Uma das primeiras preocupações no momento da implementação de uma piscicultura ou sistemas de tanque-rede em áreas fluviais é a qualidade da água e a presença de fontes de contaminação próximas a estação. Os peixes possuem brânquias projetadas para a eficiente troca de oxigênio e outras moléculas essenciais, que o torna principal órgão de respiração dos peixes. Infelizmente, os mesmos projetos fisiológicos que fazem tão bem sucedida a vida aquática também levam à absorção constante de muitos produtos químicos não essenciais,

como metais pesados, toxinas e pesticidas. Assim, os organismos aquáticos são capazes de absorver e acumular uma variedade de produtos químicos do ambiente (SPACIE & HAMELINK, 1985).

Entre os pesticidas agrícolas mais empregados para controle de doenças em peixes é o diflubenzuron, conhecido pela sua ação rápida e eficiente no combate a *Dolops carvalhoi* (Argulus), *Lernaea cyprinacea* (Lerneia), também comumente utilizado na erradicação de larvas de mosquitos do gênero *Aedes* em regiões urbanizadas e no controle de *Haematobia irritans* (Moscas-do-chifre) na pecuária (ESTEVES & ISHIKAWA, 2006; MABILIA & SOUZA, 2006; LUVIZOTTO et al., 2009; SCHALCH et al., 2009; PORTO et al., 2012).

2. 3. Diflubenzuron

O diflubenzuron (DFB) consiste em um praguicida derivado da ureia que atua como inibidor de enzimas responsáveis pela ecdise, impedindo a síntese de quitina do exoesqueleto dos artrópodes (MULLA & DARWAZEH, 1976). Pertence ao grupo químico benzoiluréia, sobre a fórmula de 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea observada na Figura 2 (WEXLER, 2000). Sua fase de ação acontece após a ingestão do composto, que leva a inibição e decomposição da quitina nas fases imaturas dos ectoparasitas, dificultando a formação de nova população de parasitos (ROMEO et al., 2009).

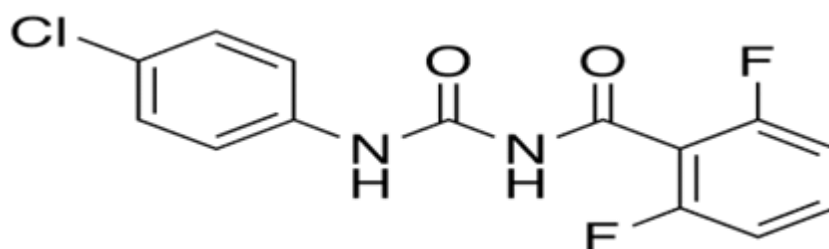


Figura 2. Fórmula química do composto Diflubenzuron ($C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$). Fonte: www.trc-canada.com

Mesmo sendo um pesticida agrícola, o DFB tem sido utilizado no controle de ectoparasitas nas pisciculturas continentais (MABÍLIA et al., 2008). O uso constante do produto pode comprometer a qualidade da água e colocar em risco crustáceos e insetos presente na biota aquática (MADUENHO; MENDES & MARTINEZ, 2007).

Apesar da toxicidade do diflubenzuron ser baixa segundo dados da Pesticide Action Network North America (PANNA), vários ensaios laboratoriais demonstraram que o DFB é tóxico para os peixes (KREUTZ et al., 2008; MADUENHO & MARTINEZ, 2008; LUVIZOTTO-SANTOS, 2009; LANGFORD, 2014). Todavia, alguns estudos testando a eficácia do diflubenzuron no controle parasitário, descrevem efeitos não nocivos em peixes tratados (MABÍLIA & SOUZA, 2006; PELLI et al., 2008; ZAIDI & SOLTANI, 2013). Deste modo, os efeitos tóxicos dos pesticidas em geral podem variar conforme as concentrações e as espécies tratadas.

Após três dias de tratamento com diflubenzuron, é possível identificar melhoras nas condições de saúde dos peixes quando alimentados com ração contendo o pesticida (SCHALCH, 2006). O mesmo autor afirma que mesmo com a eficiência no combate a parasitos, este inseticida deve ser administrado com cautela, pois não existe legislação no Brasil para o uso de pesticidas em peixes ou outros organismos aquáticos e seus eventuais impactos ao meio ambiente. Em vista a esse cenário, o tratamento com antiparasitários não registrados para piscicultura possivelmente deve ser realizado em quarentenários e respeitar o tempo de carência em peixes de produção destinado ao consumo.

É difícil estimar com precisão o impacto do diflubenzuron sobre os organismos aquáticos justamente por existir uma variabilidade de fatores que atuam na determinação da sua meia vida, considerando as particularidades de cada meio ambiente (MABÍLIA & SOUZA, 2006). Sabe-se que na proliferação de parasitos em sistemas aquícolas implica a utilização de produtos químicos, e embora os efeitos do uso inadequado de pesticidas possam gerar problemas ambientais, Schalch et al. (2005) recomenda o uso parcimonioso e fora do ambiente de criação, assim como práticas que evitam a entrada tanto de drogas quanto parasitos em ambientes próximos as pisciculturas.

Durante o tratamento antiparasitário, além da possível intoxicação e contaminação dos peixes as pisciculturas que otimizam sua produção através de sistemas intensivos como tanques-rede, geralmente estão localizadas em regiões onde são despejados resíduos industriais e agrícolas (SAMUELSEN et al., 2014). A intoxicação de peixes comerciais pode ser direta, por meio de manejo na estação ou indireta através da produção de pescado em zonas contaminadas. Novos estudos são realizados para definir os efeitos e o perigo que o diflubenzuron pode exercer sobre a população exposta (BARATA-SILVA et al., 2015).

A ação tóxica do inseticida foi observada também em humanos através de relatos de caso, encontrando correlação na fibrose pulmonar e pneumonia por hipersensibilidade em indivíduos expostos ao agente tóxico, estes resultados indicam discrepância nos efeitos tóxicos do composto, podendo variar desde intoxicação por exposição à simples intoxicação ocupacional (SILVA, 2013; SOUZA, 2014). Outro aspecto importante sobre o DFB é a formação do composto p-cloroanilina (PCA), composto conhecido por ser carcinogênico, e pode ser determinada sua concentração no filé de peixes expostos através da técnica de HPLC (LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009). Em exposição crônica é possível observar efeitos carcinogênicos e mutagênicos dos seus metabólitos após a exposição ao diflubenzuron (VICENTE & TOLEDO, 2003; OGA, 2008).

Na Noruega o inseticida também é muito utilizado na produção de salmão, porém após a aplicação do tratamento é necessário intervalo de 60 dias antes do pré-abate dos peixes para prevenir a presença de resíduos na carcaça de salmões destinados a exportação (OSSENDORP & VELDE-KOERTS, 2002). Um dos principais metabólitos formados após a biotransformação do diflubenzuron é o PCA, e em salmonídeos expostos ao diflubenzuron foram identificados no fígado três componentes: o próprio DFB antes da degradação, 4-cloroanilina e 4-clorofenilureia (CPU), sendo a concentração de PCA em menor proporção (LUNESTAD et al., 2015). A formação de p-cloroanilina pode ser prejudicial aos organismos expostos ao diflubenzuron, segundo Barata-Silva et al. (2015) a presença do metabólito é o principal responsável pela formação de sulfemoglobina e metemoglobina. A metemoglobina (MHb) é conhecida por ser uma forma da hemoglobina incapaz de transportar oxigênio, e a presença do PCA pode induzir a oxidação de um dos átomos de ferro presentes na composição da hemoglobina impedindo sua ligação ao oxigênio ou gás carbônico (LIMA et al., 2008). Entretanto, diversos compostos estão associados a formação de MHb desde fenôis à alteração da qualidade da água como o nitrito (LACKNER, 1998). O nitrito combina-se com a hemoglobina para formação de metemoglobina, neste contexto, a concentração do PCA no organismo pode surgir como biomarcador de exposição melhor que a metemoglobina (GREGUS et al., 2001; MARTINEZ & SOUZA, 2002; LIMA et al., 2008).

Os metabólitos produzidos na degradação do pesticida são excretados principalmente através da urina. Em estudos sobre o metabolismo do diflubenzuron em ratos foram observadas concentrações de PCA e CPU na urina, sendo que as concentrações dos dois metabólitos representavam cerca de 2% da dose administrada de diflubenzuron na ração (SOLECKI, 2004).

Não existe uma concentração de diflubenzuron padrão no combate a ectoparasitos em pisciculturas, a concentração e o tempo de administração podem variar conforme o nível de infestação, categoria e respostas dos peixes e parasitas ao tratamento. Segundo Luvizzotto et al. (2009), as concentrações de diflubenzuron mais frequentes observadas nas pisciculturas na região sudeste é de 70 à 80 mg L⁻¹, sendo o pesticida agrícola mais empregado no controle de ectoparasitas.

2. 4. Testes de Toxicidade

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo alvo, sob condições específicas de exposição (OGA, 2008). As respostas apresentadas após a intoxicação podem variar desde leves como mudança comportamental, estresse, queda do consumo, até respostas mais severas como disfunção hepática e renal, danos nas brânquias devido ao constante contato com água, necrose e óbito.

Além de avaliar as lesões causadas no organismo pelos contaminantes, os testes de toxicidade investigam os mecanismos envolvidos e permite determinar os níveis toleráveis pelo indivíduo. Ou seja, a toxicologia tem como finalidade prevenir os efeitos indesejáveis ao organismo alvo e estabelecer métodos seguros no emprego de substâncias químicas.

Dentre as diversas áreas de toxicologia existentes, destaca-se a toxicologia experimental, que tem como objetivo complementar os dados de toxicidade de determinado produto visando à manutenção da saúde do indivíduo exposto. A avaliação toxicológica depende da análise da resistência dos animais ao contato inicial à substâncias químicas, associado a características qualitativa e quantitativa do contato, concentração e tempo de exposição, respectivamente (OGA, 2008). Os testes de sobrevivência de animais aquáticos não dependem apenas de seu estado biológico, mas também da toxicidade do reagente e o tempo de exposição ao agente tóxico (VENTURA et al., 2015).

Durante este teste é observado a interação das substâncias em um organismo vivo, relacionando seus efeitos com a concentração e o tempo de exposição ao contaminante. Para análise dos resultados, são realizados experimentos com bioindicadores específicos que resultam na avaliação dos riscos de intoxicação a um composto químico (SPRADA, 2013).

Estudos sobre os efeitos tóxicos causados por pesticidas e herbicidas compreendem um ramo da toxicologia chamado ecotoxicologia. Este estudo tem como finalidade avaliar os danos referentes à exposição de organismos vivos ao ambiente contaminado. Os bioindicadores de resposta mais comuns são as algas, bactérias, peixes e crustáceos, por serem susceptíveis a pequenas mudanças no ambiente aquático (OGA, 2008).

Os testes de toxicologia podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição, caracterizados como intoxicação aguda, sobreaguda ou crônica. Neste estudo foi adaptado o teste de intoxicação aguda e sobreaguda, onde foi realizado um contato único (dose única) com o contaminante em um período inferior a 24 horas, com efeitos observados em alguns dias após a exposição. As exposições repetidas a substância química foi adaptados aos métodos comuns de intoxicação sobreaguda, realizadas em um período inferior a um mês (RUPPENTHAL, 2013).

3. 5. Biomarcador Hematológico

Durante os estudos toxicológicos é importante a escolha dos biomarcadores utilizados para identificar e quantificar as respostas ocasionadas pelo agente tóxico. Como as brânquias possuem contato direto com o ambiente aquoso, qualquer alteração indesejável na água é refletida no sistema circulatório dos peixes. Logo, estudos sobre hematologia dos bioindicadores podem ser utilizados para indicar o estado de saúde dos peixes e a qualidade da água (ADHIKARI et al., 2004).

O conhecimento da resposta hematológica é imprescindível para o pesquisador compreender ações da defesa orgânica animal, e desenvolver estratégias para profilaxia de enfermidades na aquicultura (COSTA et al., 2014). O uso de apenas uma ferramenta, como a hematologia, pode não gerar resultados representativos sobre o diagnóstico de contaminação. As variações no perfil hematológico podem estar ligadas a diversos motivos, não especificando a causa pontual de sua alteração.

A aplicação da contagem diferencial do sangue é limitada devido à falta de estudos e padronização da morfologia celular da maioria das espécies de peixes. Assim, o desenvolvimento de estudos que avaliam os efeitos de xenobióticos sobre os parâmetros sanguíneos são necessários para proporcionar maiores conhecimentos sobre a resposta do marcador biológico a diferentes níveis de contaminação (CORREA et al., 2016).

A análise do perfil hematológico associado às respostas histopatológicas é um método sensível para diagnosticar os efeitos tóxicos que afetam os animais, diretamente ou indiretamente, auxiliando na compreensão profunda de uma determinada situação patológica. Os parâmetros hematológicos podem servir como biomarcadores no monitoramento do bem estar dos peixes, sendo utilizados como ferramenta para o diagnóstico de estresse, intoxicação por produtos químicos presentes no ambiente ou devido à presença de agentes infecciosos (SILVA et al., 2012).

3. 6. Biomarcador Histológico

Além da hematologia, outra ferramenta indispensável para quantificar os efeitos de exposição a contaminantes é a histologia, os hepatócitos são capazes de realizar a metabolização de substâncias exógenas através de enzimas hepáticas (MENKE et al., 2011). Segundo Al-Yousuf et al. (2000), o fígado é o tecido mais recomendado como biomarcador de ambiente contaminado em comparação a outros órgãos de função metabólica. A histologia hepática gera dados sobre lesões em níveis teciduais, considerando o metabolismo normal dos animais e suas respectivas adaptações a diferentes alterações ambientais. Com isso, a escolha dos órgãos que serão avaliados é crucial para a relevância dos dados, recomendados órgãos de contato direto com o produto químico, como as brânquias e órgãos responsáveis pelo metabolismo, biotransformação e excreção de xenobióticos, como o fígado e rim (LINS et al., 2010).

O fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação de substâncias que são absorvidas pelos peixes, o tecido hepático tem um importante papel na fisiologia, controlando diversas funções vitais de organismo aquáticos (BOMBONATO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008). É um órgão compacto, pode ser dividido em lobos dependendo da espécie, localizado ventralmente na cavidade celomática, com seu tamanho, forma e volume adaptado ao espaço utilizado pelas vísceras, variando muito entre as espécies. Por ser um tecido muito vascularizado, o fígado apresenta uma coloração avermelhada podendo variar sua pigmentação conforme o estoque de gordura. Em sua estrutura é possível observar vasos de grande calibre, sinusoides, ductos biliares, tecido pancreático e em algumas espécies a presença de centro melanomacrófago (COSTA et al., 2012).

Uma característica intrínseca do órgão é seu acúmulo constante de sangue branquial, sendo um dos primeiros órgãos junto das brânquias a entrar em contato com os xenobióticos. Tal fato pode ser explicado pela sua função metabólica e a necessidade do organismo em combater e excretar possíveis agentes tóxicos logo após serem absorvidos pelo corpo. A grande capacidade metabólica do fígado faz dele um dos principais órgãos de proteção. Porém, sua constante exposição a agentes tóxicos durante os processos metabólicos o torna alvo, podendo levar a alterações em sua estrutura e função (HILTON et al., 2008).

Os animais são capazes de realizar a biotransformação para detoxificação de substâncias químicas nocivas ao organismo. Mesmo com essa prática, é imprescindível o controle e adequação ao uso de agrotóxicos, produtos químicos lícitos ou ilícitos, terapêuticos ou não, pois o organismo tem seus limites e o excesso de metabólitos criados no processo de detoxificação podem causar graves danos ou mutações nos tecidos (OSHIDA-FRANCO & FRANCO, 2003).

A biotransformação é um processo metabólico de extrema importância, pois a não ocorrência desta etapa, tornaria o organismo um depósito de xenobióticos por tempo indeterminado. As enzimas presentes nas membranas do retículo endoplasmático liso possuem um importante papel no organismo na biotransformação (OSHIDA-FRANCO & FRANCO, 2003).

A biotransformação pode ser dividida em duas etapas, a fase I que envolvem reações de oxidação, redução e hidrólise, e a fase II onde ocorre a conjugação dos metabólitos produzidos na fase I. Durante a etapa de detoxificação do diflubenzuron no fígado, a principal via metabólica utilizada para degradação do composto é a hidrólise. Segundo o registro do produto na Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR), o diflubenzuron sofre hidroxilação do anel anilino e quebra da ponte de ureia, sendo os metabólitos p-cloroanilina e p-clorofeniluréia os principais compostos identificados, e os efeitos da administração do composto incluíram a formação de metemoglobina e alterações dos hepatócitos.

As reações de hidrólise visam a modificação dos compostos para que ocorra sua excreção pelo organismo. As enzimas de hidrólise localizam-se tanto no citosol quanto no retículo endoplasmático dos hepatócitos, conjugando componentes altamente polares no interior das células após travessia das membranas celulares por transporte ativo para então serem excretados (TANIGUCHI & GUENGERICH, 2010).



Durante este processo, o tecido hepático pode apresentar alterações morfológicas celulares, desde vacuolização à necrose dependente da concentração e o tempo de exposição ao agente tóxico (BENZE et al., 2014). A capacidade de bioacumulação dos peixes podem gerar implicações para a saúde pública conforme o consumo de animais contaminados, bem como potenciais impactos nos ecossistemas próximos a áreas agrícolas e pisciculturas (MALLIN et al., 2011). A avaliação dos riscos toxicológicos causados por pesticidas baseia-se em dados sobre os efeitos de exposição ao ambiente contaminado em organismos aquáticos não alvo (VELMURUGAN et al., 2007).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-KHALEK, A. A.; BADRAN, S. R.; MARIE, M. S. Toxicity evaluation of copper oxide bulk and nanoparticles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using hematological, bioaccumulation and histological biomarkers. **Fish Physiology Biochemistry**, v.42, p.1225-1236, 2016.
- ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJEE, A.; MAHAPATRA, C.T; AYYAPPAN, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost; *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.58, p.220 -226, 2004.
- ALMEIDA, C. G.; MARTINS, L. H. B. Enzimas hepáticas e acetilcolinesterase como biomarcadores de efeito dos agrotóxicos utilizados na cultura do *Allium sativum*. **Revista Biociências**, v. 14, n.2, p.117-126, 2008.
- AL-YOUSUF, M. H.; EL-SHAHAWI, M. S.; AL-GHAIS, S. M. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. **The Science of the Total Environment**, v. 256, p. 87-94, 2000.
- BARATA-SILVA, C. SANTOS, T. P.; GOUVEA, A. V.; LARENTIS, A. L.; MOREIRA, J. C.; SARCINELLI, P. N. Adaptação na metodologia de análise de metemoglobina como biomarcador de efeito da exposição ao agrotóxico diflubenzuron. **Química Nova**, v.38, n.4, p.533-537, 2015.
- BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C. S.; BAUMGARTNER, D. BIFI, A. G.; DEBONA, T.; FRANA, V. A. **Peixes do Baixo Rio Iguaçu**. Eduem – Editora da Universidade Estadual de Maringá, n.11, p. 72-74, 2012.

BEERLI, E. L.; LOGATO, P. V. R. **Peixes de importância para a Piscicultura Brasileira**. Lavras: Editora UFLA, 1999.

BENZE, T. P.; SAKURAGUI, M. M.; ZAGO, L. H. P.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to diflubenzuron causes health disorders in Neotropical Freshwater Fish, *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology**, v. 10, 2014.

BOMBONATO, M. T. S.; ROCHEL, S. S.; VICENTINI, C. A.; VICENTINI, I. B. F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n.1, p. 81-85, 2007.

CORREA, S. A. S.; ABESSA, D. M. S.; SANTOS, L. G.; SILVA, E. B.; SERIANI, R. Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. **Toxicological & Environmental Chemistry**, p.1-11, 2016.

COSTA, C. R. C.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

COSTA, G. M.; LIMA, A. R.; LIMA, M. G.; KFOURY-JUNIOR, J. R. Histologia e ultraestrutura do rim e rim cefálico do pacu. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n. 5, p.453-458, 2012.

COSTA, D. V.; FERREIRA, M. W.; NAVARRO, R. D.; ROSA, P. V.; MURGAS, L. D. S. Parâmetros hematológicos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de óleo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, n.3, p.754-764, 2014.

ESTEVES, K.E.; ISHIKAWA, C.M. Características gerais e práticas de manejo em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo. 2006. In: ESTEVES, K.E.; SANT'ANNA, C.L. (orgs.) **Pesqueiros sob uma Visão Integrada de Meio Ambiente, Saúde Pública e Manejo: Um Estudo da Região Metropolitana de São Paulo**. São Carlos: RiMa. p. 240, 2006.

GOMES, M. A. F.; BARIZON, R. R. M. Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011. Documentos – **Embrapa Meio Ambiente**, n. 98, p. 35, Jaguariúna, 2014.

GUIMARÃES, A. T. B.; ASSIS, H. C. S.; BOEGER, W. The effect of ttrichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.68, p.57-62, 2007.

GREGUS, Z.; KLAASSEN, C. D. Em Toxicology – The Basic Science of Poisons; CASARETT, L. J.; DOULL, J., eds.; 6 Th ed, McGraw-Hill: New York, 2001.

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; GOMES, G. R.; PITELLI, R. A.; MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do Diquate na brânquia e no fígado do Piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 107-116, 2007.

HINTON, D. E.; SEGNER, H.; AU, D. W. T.; KULLMAN, S. W., HARDMAN R. C. Liver Toxicity. In: Do Giulio & Hinton, D. E. **The Toxicology of Fishes**, (1071 p.), 2008.

INOUE, L. A. K. A.; SENHORINI, J. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Growth of pacu juveniles in nightly aerated system. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v.25, n.1, p.45-48, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Estudos e Pesquisas – Inf. 7, p.53-60, Rio de Janeiro, 2010.

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

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

LACKNER, R. “**Oxidative stress**” in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) Fish ecotoxicology. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224, 1998.

LANGFORD, K. H.; OXNEVAD, S.; SCHOYEN, M.; THOMAS, K. V. Do antiparasitic medicines used in aquaculture pose a risk to the norwegian aquatic environment. **Environmental Science & Technology**, v.48, p.7774-7780, 2014.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes com biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p.469-484, 2010.

LOPES, R. B.; PARAIBA, L. C.; TORNISIELO, V. L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**, p. 56-62, 2006.

LOPES, P. R. S.; POUEY, J. L. O. F.; ENKE, D. B. S.; CAMARGO, S. G. O. ; CORREA, G. F.; RIBEIRO, C. L. G.; MALLMANN, C. A.; PORTLENINHA, M. K.; SANTIAGO, M. F.; SOQUETTA, M. B. Efeitos das aflatoxinas sobre os parâmetros eritrocitários de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Revista da Faculdade de Zootecnia**, v. 17, p. 1-13, 2010.

LUNESTAD, B. T.; HANNISDAL, R.; SAMUELSEN, O. Safety of medical feed additives in the food chain. In: DAVIS, A. Feed and Feeding Practices in Aquaculture, Elsevier: Armsterdã, p. 251-269, 2015.

LUVIZOTTO-SANTOS, R.; CORDEIRO, P. J. M.; VIEIRA, E. M. Analysis of Diflubenzuron in Tilapia Filet by HPLC-DAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, 2009.

MABILIA, R.G., SOUZA, S.M.G. Effect of the treatment with diflubenzuron in the hematology of jundiás *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infected by *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) in 24-hour immersion baths. **Acta Scientiarum**, v. 28, p.159–163, 2006.

MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G.; OBERST, E. R. Efeito do banho de imersão de diflubenzuron no sêmen do jundiá *Rhamdia quelen* parasitado por *Lernaea cyprinacea*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, p. 661-666, 2008.

MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 148, p. 265-272, 2008.

MALLIN, M. A.; MCIVER, M. R.; FULTON, M.; WIRTH, E. Elevated levels of metals and organic pollutants in fish and clams in the cape fear river watershed. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.61, p.461-471, 2011.

MARTINEZ, C. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 133, p. 151-160, 2002.

MARTINS, M. L. Manejo Sanitário na Piscicultura. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. L. A. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**: Varela, v. 1, p. 323-332, 2004.

MENKE, A. L.; SPITSBERGEN, J. M.; WOLTERBEEK, A. P. M.; WOUTERSEN, R. A. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v. 39, p. 759-775, 2011.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (Cipermetrina e Deltametrina) em peixes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 9, v. 18, 2012.

MOURA, M. A. M.; FRANCO, D. A. S.; MATALLO, M. B. Impacto de herbicidas sobre os recursos hídricos. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, v.1, p.142-151, 2008.

MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A. The IGR Dimilin® and its formulations against mosquitoes. **Journal Economic Entomology**, v. 69, p.309-312, 1976.

NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A.; LEITE, M. B. N. L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de Poluição: bases e aplicações. In: ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**, v. 1, p. 413-432, 2006.

OGA, S. Toxicocinética. In: OGA, S. (Org.) **Fundamentos de Toxicologia**. 3 ed. Editora Atheneu, p.11-26, São Paulo, 2008.

OSHIDA-FRANCO, Y.; FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde em Revista**, n. 5, v. 9, p. 69-76, Piracicaba, 2003.

OSSENDORP, B. C.; VELDE-KOERTS, I. V.D. **Diflubenzuron**. Centre for Substances and Risk Assessment (National Institute of Public Health and the Environment – NIPHE), p.359-577, 2002.

OSTRENSKY, A.; PESTANA, D.; CASTILHO, G. G.; BORGHETTI, J. R.; PEREIRA, L. A.; CHAMMAS, M.; PIE, M. R.; BOSCARDIN, N. R.; PILCHOWSKI, R. W.; SILVA, U. A. T.; BOEGER, W. A. **Aquicultura no Brasil: O Desafio é crescer**. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO, p.275, 2008.

PELLI, A.; PAULA, D. R.; ARRUDA, A. A. M.; LOPES, J. M.; RAMOS, S. M.; REZENDE, A. P. S. Toxicidade aguda e crônica de diflubenzuron para o jáu, *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821) (Pisces, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10, n. 1, p. 51-54, 2008.

PORTO, A. D.; HOPPE, E. G. L.; GOMES, A. G.; MATA, R. S. S.; ROCHA, R. M. S. Eficácia do diflubenzuron 25% no controle da *Heamatoxia irritans* (Diptera: Muscidae): Desafio *in vitro* e a campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 617-620, 2012.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.37, n.125, p.17-50, 2012.

RANGEL, C. F.; ROSA, A. C. S.; SARCINELLI, P. N. Uso de agrotóxicos e suas implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental. **Cadernos Saúde Coletiva**, v.19, n.4, p.435-442, Rio de Janeiro, 2011.

ROMEO, B.; ALESSANDRO, A.; MARCO, C.; ROBERTA, C.; LUCIANO, D.; MAURIZIO, M.; ROBERTO, P.; RODOLFO, V.; GIANCARLO, C.; NAZARIO, L. Efficacy and lasting activity of four IGRs formulations against mosquitoes in catch basins of northern Italy. **European Mosquito Bulletin**, v.27, p.33-46, 2009.

RUPPENTHAL, J. E. **Toxicologia**. Universidade Federal de Santa Maria - Rede e-Tec Brasil, v.1, p. 19-128, 2013.

SAMUELSEN, O. B.; LUNESTAD, B. T.; HANNISDAL, R.; BANNISTER, R.; OLSEN, S.; 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 standard treatment. **Science of the Total Environment – Elsevier**, v.508, p.115-121, 2015.

SCHALCH, H. C. S. et al. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (osteichthyes: characidae) naturalmente infestados. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 297-302, 2006.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE. **Aquicultura no Brasil: série de estudos mercadológicos**. SEBRAE/DF: Brasília, 2015. [on line] Disponível em: [http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2017.

SILVA, R. D.; ROCHA, L. O.; FORTES, B. D. A.; VIEIRA, D.; FIORAVANTI, C. S. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.99-107, 2012.

SILVA, C. B. **Avaliação de exposição ao diflubenzuron em guardas de endemias da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2013.

SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C. Fatores estressantes em peixes. **Nutritime**, v. 6, n.4, p.1001-1017, 2009.

SOLECKI, R. Toxicology of miscellaneous insecticides. In: MARRS, T. C.; BALLANTYNE, B. **Pesticide Toxicology and International Regulation**, p. 160-176, 2004.

SOUZA, T. F. Intoxicação ocupacional por diflubenzuron: em relato de caso. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Estadual de Paraíba, Campina Grande, 2014.

SPACIE, A.; HAMELINK, J. L. Bioaccumulation and Bioavailability in Multiphase systems. In: RAND, G. M. PETROCELLI, S. R., (Ed.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental, Fate and Risk Assessment**, n.2, p.495-525, 1995.

SPRADA, E. Toxicologia. Instituto Federal do Paraná- e-Tec Brasil, v.1, p.21-139, 2013.

SPADOTTO, C. A. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna, p.29, 2004.

TANIGUCHI, C.M.; GUENGERICH, F. P. Drug metabolism. In: Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy, 3rd. Ed(s) DE GOLAN, A. H.; TASHJIAN, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Lippincott Williams and Wilkins: Baltimore**, p.49-61, 2010.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n.2, p.429-431, 1999.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v. 64, p. 135-42, 2002.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Orgs.) **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, p.225-255, 2005.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.22, n.11, p.2391-2399, 2006.

VELMURUGAN, B.; SELVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E. I. The effects of monocrotophos to different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.78, p.450-454, 2007.

VENTURA, A. S.; CORSINI, F. E.; GABRIEL, A. M. A. Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes. **Nutritime: Revista eletrônica**, v.12, n. 6, p.1-8, 2015.

VICENTE, E.; TOLEDO, M. C. F. Desenvolvimento de metodologia para determinação de 4-Cloroanilina em frangos por cromatografia gasosa – espectrometria de massas, análise em tecidos tratados com digluconato de clorhexidina após o processamento térmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 71-78, 2003.

WEXLER, P. Diflubenzuron. In: **Encyclopedia of Toxicology**, 2th ed., Elsevier: Amsterdã, p. 146-149, 2000.

ZAIDI, N.; SOLTANI, N. Laboratory evaluation of environmental risk assessment of pesticides for mosquito control: toxicity of dimilin on a larvivorous fish, *Gambusia affinis*. **Advances in Environmental Biology**, p. 605-613, 2013.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E HISTOLOGIA DO FÍGADO DE PACU *Piaractus mesopotamicus* EXPOSTOS AO DIFLUBENZURON

André Luiz do Nascimento Silva¹, Carlos Eurico dos Santos Fernandes²

¹ Mestrando em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: andre_nascimento129@hotmail.com

² Professor do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Email: carlos.fernandes@ufms.br

Resumo: O presente estudo avaliou o perfil hematológico e alterações histológicas no fígado de *Piaractus mesopotamicus* expostos ao pesticida Diflubenzuron (DFB), na concentração de 70 mg L⁻¹ por meio de banho de imersão, em diferentes períodos. Os *P. mesopotamicus* foram sujeitos a três períodos de exposição: 30, 60 e 120 minutos, com objetivo de verificar o efeito tóxico do produto em cada tratamento. Para avaliação dos parâmetros hematológicos foi realizado eritrograma, leucograma e cálculos dos índices hematimétricos, e os achados histológicos foram classificados conforme a gravidade e a intensidade das lesões. Os exemplares expostos por 30 minutos apresentaram redução na hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média e foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) no número de leucócitos totais em pacus expostos por 60 minutos ao diflubenzuron, quando comparados ao grupo controle. O estudo histológico revelou alterações no tecido hepático dos animais expostos ao DFB. Após os ensaios os peixes apresentaram alterações regressivas, circulatório e inflamatório, como vacuolização dos hepatócitos, degeneração hidrópica difusa, presença de infiltrado inflamatório, congestão e núcleos picnóticos em algumas amostras. Os resultados indicam que o xenobiótico é pouco tóxico para a espécie, mesmo com alterações nos parâmetros hematológicos e no tecido hepático após exposição aguda ao diflubenzuron.

Palavras - chave: Efeitos tóxicos, toxicologia, xenobióticos.

HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND HISTOLOGICAL OF LIVER IN PACU *Piaractus mesopotamicus* EXPOSED WITH DIFLUBENZURON

Abstract: The present study evaluated the haematological profile and histological changes in the liver of *Piaractus mesopotamicus* exposed to the pesticide Diflubenzuron (DFB), in concentration of 70 mg L⁻¹ through bath, in different periods. The *P. mesopotamicus* were subject three periods of exposure: 30, 60 and 120 minutes, in order to check the toxic effect of the product on each treatment. For evaluation of hematologic parameters was performed erythrogram, white bloods cells (WBC) and calculations of hematimetric parameters, and the histological findings were classified according to the severity and intensity of the lesions. The specimens exposed for 30 minutes showed reduction in hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration, and it was observed significant increase ($P < 0,05$) in the number of total leukocytes in pacus exposed for 60 minutes of diflubenzuron, when compared to the control group. The histological study revealed severe changes in the liver tissue of animals exposed to the DFB. After the tests the fish showed regressive , circulatory and inflammatory changes, as vacuolization of hepatocytes, hydropic degeneration diffuse, presence of focal inflammatory infiltrate, congestion and picnotic nuclei in some samples. The results indicate that the xenobiotic is not very toxic to the species, even with changes in the hematological parameters and in the hepatic tissue after acute exposure to diflubenzuron.

Keywords: Toxic effects, toxicology, xenobiotics.

INTRODUÇÃO

O pacu é uma das espécies mais frequentes na produção de peixes continentais, produzido em cerca de 80% dos sistemas de produção comercial em todos os estados brasileiros (LOPES et al. 2006). Entre as espécies tropicais cultivadas, o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) surge como produto de grande potencial para as pisciculturas devido ao fácil manuseio da espécie, a taxa de crescimento satisfatório e a grande aceitação pelo consumidor (JOMORI et al., 2003).

No Brasil não existe regulamentações específicas para uso de inseticidas no tratamento de peixes cultivados, segundo Guimarães et al. (2007) o uso de produtos químicos representa uma alternativa para reduzir os prejuízos econômicos associados a epidemias frequentes nas pisciculturas continentais. Entretanto, as complexidades dos sistemas intensivos dificultam a avaliação dos efeitos causados pelo uso de pesticidas agrícolas, e quando usadas em tratamento de doenças de peixes são um risco para o homem e ao meio ambiente (LOPES et al., 2006; MABILIA et al., 2008).

O diflubenzuron (DFB) pertencente ao grupo químico benzoiluréia, sobre a fórmula de 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea (WEXLER, 2000), consiste em um praguicida derivado da ureia que atua como inibidor de enzimas responsáveis pela ecdise, impedindo a síntese de quitina do exoesqueleto dos artrópodes (MULLA & DARWAZETH, 1979). Mesmo sendo um pesticida agrícola, o diflubenzuron tem sido utilizado no controle de ectoparasitas nas pisciculturas continentais em diversas regiões do país (ESTEVES & ISHIKAWA, 2006; MABÍLIA et al., 2008; LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009). A ausência de padronização ou recomendação de inseticidas na piscicultura contribui para que ocorra o aumento dos níveis do xenobióticos no ambiente, de maneira geral o diflubenzuron pode comprometer a qualidade de água, colocar em risco a saúde dos peixes, crustáceos e insetos presentes na biota aquática (MADUENHO; MENDES & MARTINEZ, 2008; SILVEIRA et al., 2009).

A variação nos efeitos tóxicos dos pesticidas relacionado as concentrações e as espécies tratadas, impulsionam estudos laboratoriais com espécies nativas na busca de maximizar a produção por meio de testes que fornecem condições adequadas e controladas, fundamentais para a regulamentação e classificação quanto ao potencial tóxico do produto químico (BEERLI et al., 2004; HENARES et al., 2007; VELMURUGAN et al., 2007). Neste contexto, apesar da toxicidade do diflubenzuron ser baixa segundo dados da Pesticide Action Network North America (PANNA), vários ensaios laboratoriais demonstraram que o

85 diflubenzuron é tóxico para os peixes (KREUTZ et al., 2008; MADUENHO & MARTINEZ,
86 2008; LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009; LANGFORD, 2014). Todavia, alguns estudos
87 testando a eficácia do diflubenzuron no controle parasitário, descrevem efeitos não nocivos
88 em peixes tratados (MABÍLIA & SOUZA, 2006; PELLI et al., 2008; ZAIDI & SOLTANI,
89 2013).

90 Foram relatados efeitos cancerígenos em animais que apresentaram resíduos de p-
91 cloroanilina (PCA) no organismo após exposição ao DFB, porem segundo FAO (2001) os
92 resultados são insuficientes para estimar a toxicidade do metabólito. Com isso necessita-se de
93 mais estudos toxicológicos para compreender os efeitos tóxicos do diflubenzuron e a resposta
94 do organismo na presença do contaminante.

95 O conhecimento da resposta hematológica é imprescindível para que o pesquisador
96 consiga compreender as ações de defesa orgânica animal, e desenvolver estratégias para
97 profilaxia de enfermidades na aquicultura (COSTA et al., 2014). A análise do perfil
98 hematológico associado às respostas histopatológicas são ferramentas úteis e sensíveis para
99 diagnosticar os efeitos tóxicos que afetam os animais, diretamente ou indiretamente,
100 auxiliando na compreensão profunda de uma determinada situação patológica. Em testes
101 toxicológicos, os parâmetros hematológicos podem servir como biomarcadores no
102 monitoramento do bem estar dos peixes, sendo utilizados como ferramenta para o diagnostico
103 de estresse, intoxicação por produtos químicos presentes no ambiente ou à presença de
104 agentes infecciosos (SILVA et al., 2012).

105 A histologia gera dados sobre lesões em níveis teciduais, considerando o metabolismo
106 normal dos animais e suas respectivas adaptações a diferentes alterações ambientais. Com
107 isso, a escolha dos órgãos que serão avaliados é crucial para a relevância dos dados, sendo
108 recomendados órgãos de contato direto com o produto químico, como as brânquias e órgãos
109 responsáveis pelo metabolismo, biotransformação e excreção de xenobióticos, como o fígado
110 e rim (LINS et al., 2010).

111 Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos do tratamento químico
112 utilizando diflubenzuron na concentração de 70 mg L⁻¹ em diferentes tempos de exposição,
113 por meio de banhos de imersão. Foram investigados os efeitos do diflubenzuron sobre as
114 variáveis hematológicas e histológicas do fígado em *P. mesopotamicus* em diferentes tempos
115 de exposição.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo e Amostragem de peixes

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia Experimental (Lapex), no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Para este estudo foram utilizados 60 exemplares de *P. mesopotamicus*, com comprimento total médio de $12,38 \pm 1,40$ cm e peso médio de $34,57 \pm 8,74$ g. Os peixes foram aclimatados por 15 dias em aquários de 170 L em sistema semi-estático, com aeração contínua e renovação de 25% do volume total de água a cada 48 horas, para adaptação dos peixes às condições do laboratório.

Ensaio Experimental

O experimento foi dividido em três ensaios distintos, nos quais os peixes foram expostos ao diflubenzuron na concentração de 70 mg L^{-1} , por meio de banhos de imersão em intervalos de 24 horas (LUVIZOTTO et al., 2009). A concentração e o período de exposição foram baseados em tratamentos terapêuticos convencionais aplicados nas pisciculturas. Para a preparação da dose utilizada, foi realizado calculo baseado na concentração do princípio ativo na composição do produto comercial (24% de DFB).

Em cada ensaio foram utilizados 20 peixes, sendo 10 expostos ao diflubenzuron e 10 não expostos ao inseticida. No tratamento I (TI) foram realizados três banhos de imersão com duração de 30 minutos. No segundo tratamento (TII) foram realizados seis banhos de imersão com duração de 60 minutos. E no último tratamento (TIII) foram realizados seis banhos com duração de 120 minutos. Foram aplicados intervalo de 24 horas entre os banhos durante os tratamentos e após o último banho. Posteriormente, os peixes foram anestesiados em solução de eugenol (50 mg L^{-1}), até atingirem o estágio de anestesia cirúrgica e submetidos a colheita de sangue por punção do vaso caudal com seringas e agulhas contendo EDTA à 10% (FUJIMOTO et al., 2007; BICUDO et al., 2008; SADO et al., 2014).

Após a colheita de sangue, foi medido o comprimento total e o peso total com auxilio de uma balança digital, seguido da eutanásia dos peixes por meio de aprofundamento do plano anestésico em solução eugenol na concentração de 450 mg L^{-1} (KILDEA et al., 2004), para a retirada e análise histológica do fígado. Utilizando os dados biométricos foram determinados os índices hepatossomáticos (IHS%) = peso do fígado (g)/ peso corporal (g) x

149 100; e os índices esplenossomático (IES%) = peso do baço (g)/ peso corporal (g) x 100, para
150 cada peixe.

151 Os tecidos foram fixados em formol tamponado 10% e transferidos posteriormente
152 para um recipiente contendo álcool a 70%, até as confecções dos blocos de parafina e
153 elaboração de lâminas para as análises.

154 Durante os ensaios foi realizado controle da qualidade de água em todos os grupos,
155 monitorados diariamente o pH, oxigênio dissolvido e temperatura com auxílio do medidor
156 multiparâmetro (Sanxin - Modelo SX751A). As análises foram realizadas duas vezes ao dia,
157 nos períodos de manhã e tarde, para verificar se os parâmetros da água mantiveram
158 equivalentes para todos os grupos durante todo o período experimental.

159

160 **Parâmetros Hematológicos**

161 Os parâmetros hematológicos avaliados foram: hematócrito (Htc), após a
162 centrifugação do sangue (12.000 g/ 5 min) em tubos microcapilares e posterior leitura em
163 escala padronizada (GOLDENFARB et al., 1971); concentração de hemoglobina (Hb),
164 segundo o método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944); e contagem do número de
165 eritrócitos em câmara de Neubauer, após diluição do sangue em solução de formol citrato
166 (1:200).

167 A partir dos dados de hematócrito e hemoglobina foram calculados o volume
168 corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM),
169 segundo o método de Wintrobe (1934):

170

$$171 \quad \text{VCM (fL)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{N}^\circ \text{ de Eritrócitos (x } 10^6 \text{ } \mu\text{L}^{-1})} \quad \text{CHCM (g dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Taxa de Hb} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

172

173 Para a contagem diferencial/total de leucócitos e trombócitos foram confeccionadas
174 extensões sanguíneas em duplicata, secas ao ar e coradas pancromicamente com May
175 Grunwald-Giemsa-Wright, conforme os protocolos descritos por Tavares-Dias & Moraes
176 (2003) e Ranzani-Paiva et al. (2013).

177

178

179

Procedimentos Histológicos

Os fragmentos do fígado foram emblocados em parafina, cortados a 3 µm e corados com solução hematoxilina e eosina (H&E), seguindo os processos histológicos de rotina. Os cortes foram analisados em microscópio óptico, e as alterações encontradas foram classificadas de acordo com a frequência e a importância da lesão.

As respostas histológicas foram avaliadas de acordo com os protocolos proposto por Bernet et al. (1999). As alterações encontradas foram classificadas em: Distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e tumor. As alterações presentes foram avaliadas conforme o fator de importância das lesões e a possibilidade de recuperação do órgão afetado, como: 1 - Importância patológica mínima, as lesões são reversíveis após o término da exposição; 2 - Importância patológica moderada, as lesões são reversíveis na maioria dos casos após a neutralização do agente estressor; 3 - Importância patológica elevada, as lesões são irreversíveis com perda parcial ou total da função hepática. O cálculo dos índices de cada órgão ($I_{org.}$) foi proposto através da soma do número de lesões, multiplicados pelo coeficiente do respectivo fator de importância, utilizando a fórmula:

$$I_{org.} = \sum (a \times w)$$

onde a representa a frequência das lesões, e w são valores em escore dos fatores de importância das lesões distribuídas nas lâminas histológicas. Os valores dos índices de cada órgão foram usados para calcular a média para cada grupo, controle e tratados.

Análise Estatística

Os resultados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney U, para comparação de pares de médias, considerando-se o nível de 5% de significância ($P < 0,05$). Os dados foram expressos em médias e desvio padrão utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

Os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se sem variações significativas durante o período experimental, com valores entre 2,89 a 4,26 para o oxigênio dissolvido (mg/L), 25,35 a 26,40 para temperatura (°C) e 6,47 a 7,37 para o pH.

Não houve mortalidade durante o período experimental. Os valores médios e respectivos desvios do eritrograma estão descritos na Tabela 1. Houve redução da hemoglobina e da concentração corpuscular média apenas nos peixes do tratamento I em relação ao grupo controle. Nos demais valores, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ d.p.) do eritrograma de pacus (*P. mesopotamicus*) expostos ao Diflubenzuron (70 mg L⁻¹) de acordo com o tempo de exposição.

	Tempo (min.)	Sob. (%)	Htc. (%)	Hb. (g/dL)	VCM (μ^3)	CHCM (%)	Eritroc. totais ($\times 10^6$)
Controle (n=30)	-	100	33,90 $\pm$ 6,27	7,2 $\pm$ 1,57	221,35 $\pm$ 47,33	21,58 $\pm$ 4,67	1,55 $\pm$ 0,22
I (n=10)	30	100	32,30 $\pm$ 4,14	5,7 $\pm$ 1,27*	197,10 $\pm$ 16,27	17,63 $\pm$ 3,74*	1,65 $\pm$ 0,25
II (n=10)	60	100	35,80 $\pm$ 5,31	7,5 $\pm$ 0,85	212,93 $\pm$ 37,98	21,31 $\pm$ 2,74	1,71 $\pm$ 0,23
III (n=10)	120	100	30,20 $\pm$ 2,04	6,6 $\pm$ 0,94	199,86 $\pm$ 25,99	21,84 $\pm$ 2,13	1,53 $\pm$ 0,22

Tratamento I: 30 minutos; Tratamento II: 60 minutos; Tratamento III: 120 minutos; d.p.: desvio padrão;

Sob.: taxa de sobrevivência; Htc.: hematócrito; Hb.: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Eritroc.:eritrócitos;

* Médias seguidas por asterisco diferem entre Controle x Tratamento pelo teste de Mann-Whitney U (P<0.05);

Na análise do leucograma, não houve diferença significativa no percentual de monócitos, linfócitos, neutrófilos, células granulocíticas especiais, bem como no total de trombócitos ($\times 10^3$) entre os tratamentos e entre estes com o grupo controle (Tabela 2). Porém, a contagem total de leucócitos ($\times 10^6$) foi maior no tratamento II, quando os peixes foram expostos por 60 minutos.

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ d.p.) do leucograma, leucócitos e trombócitos totais de pacus (*P. mesopotamicus*) expostos ao Diflubenzuron (70 mg L⁻¹) de acordo com o tempo de exposição.

Tratamento	Tempo (min.)	Mon. (%)	Linf. (%)	Neut. (%)	C.G.E. (%)	Leuc. totais (10 ³)	Tromb. totais. (10 ³)
Controle (n=30)	-	2,80 $\pm$ 1,30	92,77 $\pm$ 2,92	3,33 $\pm$ 2,06	0,98 $\pm$ 1,00	12,16 $\pm$ 4,08	36,01 $\pm$ 8,41
I (n=10)	30	3,39 $\pm$ 1,87	92,61 $\pm$ 2,60	3,67 $\pm$ 1,09	0,33 $\pm$ 0,56	14,17 $\pm$ 4,44	42,53 $\pm$ 9,13
II (n=10)	60	2,85 $\pm$ 1,76	90,50 $\pm$ 2,55	4,60 $\pm$ 1,41	1,30 $\pm$ 1,38	27,58 $\pm$ 8,03*	36,44 $\pm$ 7,61
III (n=10)	120	2,90 $\pm$ 0,91	92,60 $\pm$ 2,67	3,85 $\pm$ 2,06	0,50 $\pm$ 0,64	12,82 $\pm$ 5,83	37,88 $\pm$ 9,35

Tratamento I= 30 minutos; Tratamento II= 60 minutos; Tratamento III= 120 minutos; $\pm$ d.p.: desvio padrão;

Mon.: Monócito; Linf.: Linfócito; Neut.: Neutrófilo; CGE: Células granulocíticas especiais; Leuc. totais: Leucócitos totais; Tromb. totais: Trombócitos totais;

* Médias e desvio padrão seguidas por asterisco diferem entre Controle x Tratamento pelo teste de Mann-Whitney U (P<0.05).

A análise histológica revelou alterações vacuolares no fígado dos peixes em todos os tratamentos, porém, essas foram mais evidentes e difusamente distribuídas nos peixes do tratamento II. Estas alterações caracterizaram-se por vacúolos citoplasmáticos de tamanho variável com ou sem deslocamento nuclear. Em algumas amostras foi possível evidenciar núcleos picnóticos, com deslocamento periférico (Figura 1).

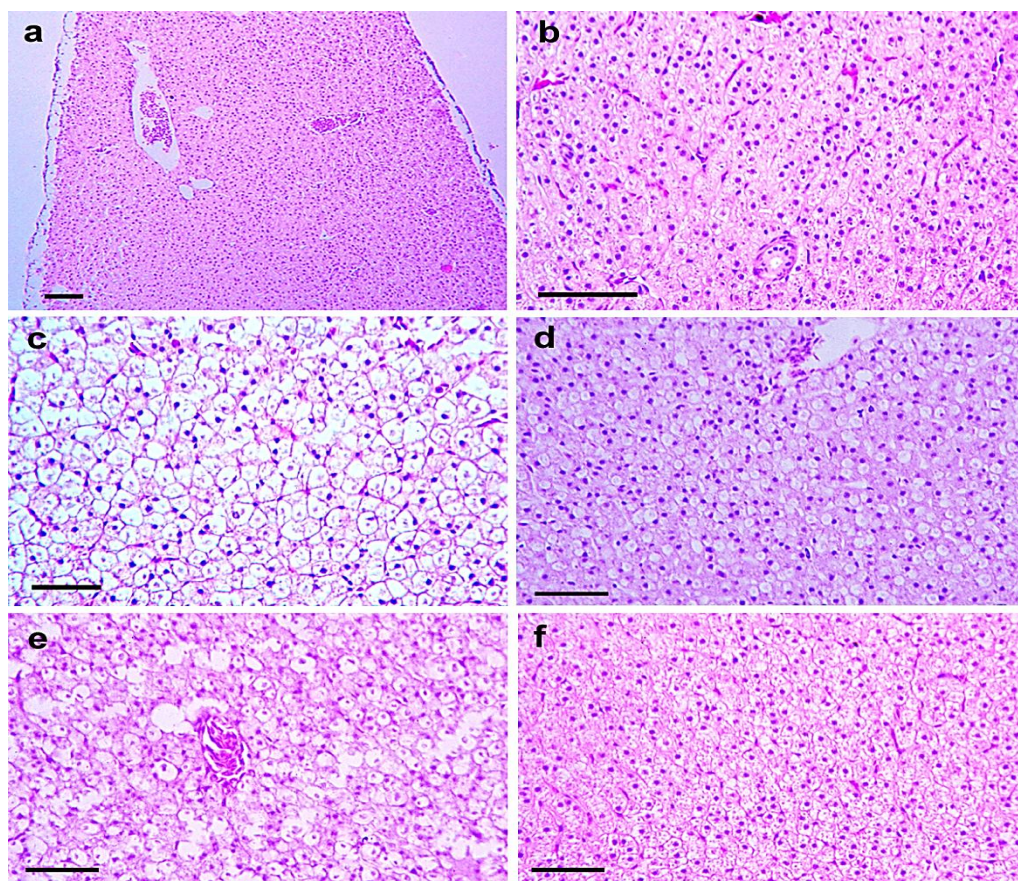


Figura 1. Secções histológicas do fígado de *Piaractus mesopotamicus* expostos ao diflubenzuron (70 mg L^{-1}): **a** e **b** grupo controle; imagens revelam homogeneidade no parênquima hepático, sinusoides parcialmente preenchidos, hepatócitos apresentam núcleos homogêneos, centralizados com disposição cordonal típica da espécie (**a**, barra = $100 \mu\text{m}$; **b**, barra = $50 \mu\text{m}$); **c**, amostra do tratamento II; hepatócitos heterogêneos, entumecidos com citoplasma vacuolizado; núcleos deslocados para a periferia celular, redução do espaço sinusoidal com perda da organização cordonal celular (**c**, barra = $50 \mu\text{m}$); **d**, amostra do tratamento III, hepatócitos com micro e macrovacuolização citoplasmática, núcleos deslocados para periferia, heterogeneidade na organização cordonal (**d**, barra = $50 \mu\text{m}$); **e**, amostra do tratamento III, hepatócitos apresentam deformidade morfológica com perda da arquitetura cordonal, núcleos apresentam figuras variadas entre picnose e cariólise, citoplasma com intensa variação eosinofílica, células hiperfrólicas vacuolizadas, formação de pequenos nichos celulares necróticos (**e**, barra = $50 \mu\text{m}$); **f**, amostra do tratamento I, destaque para a deposição de grânulos associados à tumefação citoplasmática com variações de tamanho nos hepatócitos (**f**, barra = $50 \mu\text{m}$). Coloração, H&E.

A quantificação dessas alterações resultou em valores mais elevados ($P < 0,05$) de I_{org} nos peixes, independentemente do tempo de exposição quando comparados com grupo

controle. Não houve diferença significativa nos índices esplenossomático e hepatossomático entre o grupo controle os tratamentos. Estes resultados estão expressos na Figura 2.

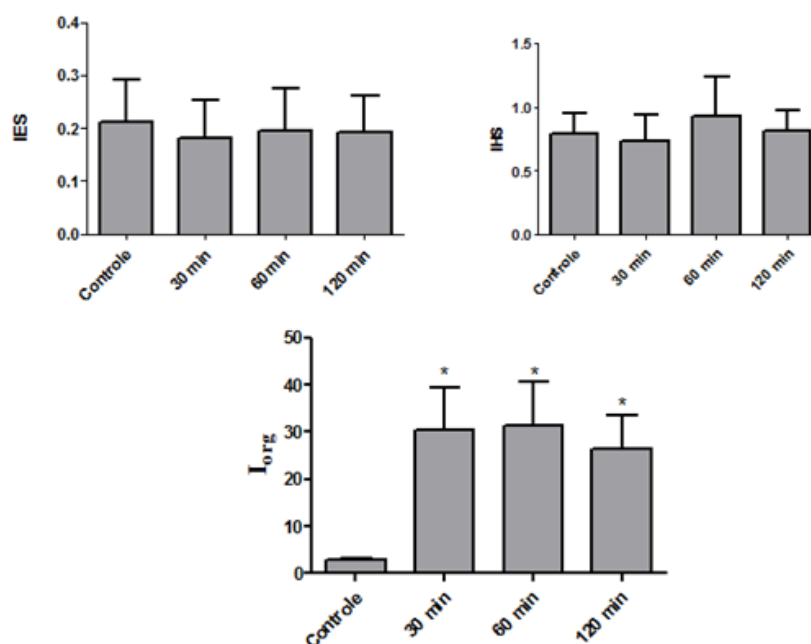


Figura 2. Índice esplenossomático (IES), índice hepatossomático (IHS) e índice de lesão do órgão (I_{org}) calculados para o fígado de *P. mesopotamicus* expostos ao DFB (70 mg L⁻¹) de acordo com o tempo de exposição. Valores seguidos por asterisco diferem entre Controle e tempo de exposição ($P < 0.05$).

6. DISCUSSÃO

O emprego do diflubenzuron na criação de peixes tem sido reportado na literatura, no entanto, parece não haver consenso quanto a dosagem, o método de aplicação e o tempo de exposição. De acordo com Luvizotto-Santos et al., (2009), este produto é o mais frequentemente utilizado nas pisciculturas do sudeste do país, com dosagens que variam entre 70 a 80 mg L⁻¹. Com base neste estudo, foi proposto a utilização de uma dosagem única de 70 mg L⁻¹, visando estabelecer respostas biológicas em *P. mesopotamicus*, uma espécie amplamente utilizada nas pisciculturas comerciais brasileiras (OSTRENSKY et al. 2008; SEBRAE, 2015). Além disso, optamos pelos banhos de imersão com tempos distintos de exposição, uma vez que estes também são considerados um fator importante quanto a resposta biológica em diferentes espécies (SCHALCH et al., 2005; MABILIA et al., 2008; PELLI et al., 2008). Contudo, as concentrações referentes aos tratamentos com o diflubenzuron variam

bastante entre estudos sendo que dosagens entre 50 e 100 mg L⁻¹ parecem seguras para uso nas criações (MADUENHO et al. 2007; PELLI et al., 2008).

De forma geral, as respostas hematológicas expressam a capacidade de defesa individual, no entanto, podem sofrer rápidas modificações em função dos agentes estressores, inibindo ou estimulando reações de caráter agudo ou crônico (SERIANI & RANZANI-PAIVA, 2012). No presente estudo, os valores observados para todas as variáveis hematológicas estão de acordo com o reportado por Tavares-Dias et al. (1999) para a espécie estudada.

O modelo proposto revelou uma resposta aguda, com variações na hemoglobina e na concentração de hemoglobina corpuscular média, aos 30 minutos e leucocitose, aos 60 minutos de exposição. A redução das taxas de hemoglobina e CHCM sugere redução dos níveis de oxigenação tecidual, um efeito esperado para peixes submetidos a exposição por agentes químicos (DAS & MUKHERJEE, 2003; MADUENHO & MARTINEZ, 2008; LIMA et al., 2008). Esse efeito foi semelhante ao reportado por Maduenho & Martinez (2008) nos peixes tratados com 25 mg durante 96h. Segundo esses autores a redução da hemoglobina está associada à hemólise intravascular, com um efeito direto da 4-cloroanelina, um metabolito degradado via citocromo P450 (FISHER & HALL, 1992; BUDINSK, 2000). Porém, nossos resultados sugerem que este efeito seja superficial, sem que tenha induzido demais alterações na resposta frente ao diflubenzuron e ao tempo de exposição. Outros estudos, com protocolos diferentes também não evidenciaram alterações expressivas no eritrograma (SCHALCH et al., 2005; MABILIA & SOUZA, 2006).

A análise do leucograma revelou apenas aumento dos leucócitos periféricos nos peixes tratados por 60 minutos, sem que tenha havido variações significativas no percentual das células leucocitárias. O número de leucócitos circulantes está envolvido em uma série de reações fisiológicas incluindo a resposta toxicológica a produtos químicos (BARCELOS et al., 2003). Adaptações a ambientes contaminados com respostas variadas são comuns em peixes e geralmente estão associadas a modulação do sistema imune inespecífico (BLAXALL, 1972; MAGNADÓTTIR, 2006). Portanto, o aumento dos leucócitos pode estar associado a uma resposta adaptativa, incluindo estímulo ao sistema linfohematopoiético. A mesma tendência foi reportada em carpas (*Labeo rohita*) expostas à cipermetrina (DAS & MUKHERJEE, 2003) e em curimatás (*Prochilodus lineatus*) expostos ao glifosato (MODESTO & MARTINEZ, 2010).

Os peixes tratados não apresentaram diferença significativa nos IHS e IES quando comparados ao grupo controle. A determinação das relações hepatosomáticas e esplenosomáticas nos peixes são ferramentas importantes para compreensão dos distúrbios que podem ocorrer em processos patológicos, sendo o baço um dos principais órgãos hematopoiéticos e o fígado o principal órgão responsável pela detoxificação (QUENTEL & OBACH, 1992; MONTANHA et al., 2011). Neste caso, a ausência de alterações nos valores de hematócrito, volume corpuscular médio e manutenção do volume do baço afasta a possibilidade de um quadro anêmico nos peixes expostos ao diflubenzuron. Os valores obtidos neste estudo sugere que os distúrbios hepáticos não foram graves a ponto de gerar alteração anormal no tamanho do fígado. A hepatomegalia normalmente é associada a insuficiência cardíaca, infecções, alterações severas no tecido hepático e anemia (RAGHIANTE et al., 2016). Possivelmente baixa ocorrência de formação de gotículas de gorduras no tecido hepático também contribuiu para manutenção do peso do fígado nos animais tratados (TAVARES-DIAS et al., 2000).

As alterações dos padrões histológicos em diversos órgãos são consideradas importantes biomarcadores nos peixes (BERNET, 1999; WOLF & WOLFE, 2005). Dentre os órgãos mais acometidos pelos processos tóxico-químicos destacam-se as brânquias, o fígado e os rins. Porém, o fígado pode ser considerado o mais importante devido suas funções de biotransformação e bioeliminação de xenobióticos absorvidos no organismo (KLEINOW et al., 2008; HINTON et al., 2008). Alterações vacuolares foram as mais expressivas encontradas em todos os tratamentos. Estas variaram desde uma simples tumefação até a esteatose. Ambos processos, porém, foram difusamente distribuídos no peixes expostos por 60 min. Nestes, também foi observado pequenos nichos de hepatócitos necróticos caracterizados por intensa eosinofilia citoplasmática, cariólise nuclear com desarranjo cordonal. Estas lesões constituem-se achados importantes, especialmente aquelas classificadas com fator de importância III, sugerem que o diflubenzuron interfira no metabolismo hepático de forma irreversível. Por outro lado, as alterações associadas à tumefação e o acúmulo de gordura sugerem estágios intermediários expressos por variações no equilíbrio das funções reguladoras celulares, uma resposta tipicamente observada na intoxicação por diversos grupamentos químicos (SCHWAIGER et al., 1997; WOLF & WOLFE, 2005).

Embora esse mecanismo não seja totalmente conhecido, é possível que os radicais eletrofílicos derivados dos compostos xenobióticos atuem clivando os ácidos graxos polinsaturados da membrana plasmática, estimulando a síntese de glutathione-S-transferase. Esta por sua vez, se conjuga com a glutathione, reduzindo os efeitos nocivos celulares. Assim,

a redução das taxas de conjugação poderia aumentar a concentração de xenobiótico levando a injúria celular (YOUNG et al., 1986). De forma geral, nossos achados são consistentes com os previamente reportados por Maduenho & Martinez (2008) e Priya et al., (2016) suportando a hipótese de que a exposição ao diflubenzuron pode induzir alterações na morfologia e possivelmente na função hepática. Cabe ressaltar que a aplicação desse produto nas pisciculturas difere do ambiente experimental onde os peixes apresentam condições ambientais apropriadas e livres de parasitas. A presença de parasitas e amplas variações na qualidade da água podem potencializar os efeitos de um agente químico aumentando as chances de perdas na produção (PAIXÃO et al., 2013; FRIES et al., 2016).

A realização de testes de toxicidade baseados em tratamentos convencionais aplicados rotineiramente em pisciculturas geram informações pertinentes sobre possíveis riscos de contaminação presentes na produção aquícola. O avanço no conhecimento dos efeitos tóxicos de quimioterápicos é fundamental para elaborar e estabelecer técnicas que não prejudiquem a saúde dos peixes e diminua riscos de contaminação ambiental.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o diflubenzuron quando usado na dosagem de 70 mg L⁻¹ na forma de banhos de imersão por 30, 60 e 120 minutos apresenta pouco efeito sobre os valores hematológicos. No entanto, provoca alterações subletais no parênquima hepático que podem afetar o desempenho e a eficiência dos peixes tratados nos sistemas comerciais.

O tratamento convencional representado neste trabalho foi considerado de baixa toxicidade para o *P. mesopotamicus*. Não foram registradas mortalidades nos peixes expostos ao diflubenzuron, e as alterações histológicas em sua maioria são reversíveis após o término da exposição, indicando que o inseticida não apresentou efeitos severos no tratamento proposto.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/CAPES nº 07/2015 – GM - 59/300.350/2015) pelo

suporte financeiro para a realização do estudo, e a equipe do Laboratório de Patologia Experimental (Lapex) pelo auxílio durante as atividades experimentais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., RODRIGUES, L.B., FIOREZE, I., QUEVEDO, R.M., CERICATO, L., CONRAD, J., SOSO, A.B., FAGUNDES, M., LACERDA, L.A., TERRA, S. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia Quelen*, Quoy & Gaimard, Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1465– 1469, 2003.

BEERLI, E. L.; LOGATO, P. V. R.; FREITAS, R. T. F. Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n. 1, p.149-155, 2004.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BICUDO, J. A.; SADO, R. Y.; CYRINO, J. E. P. Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 486-495, 2008.

BLAXALL, P. C. The haematological assessment of the health of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 4, p.593-604, 1972.

BUDINSKI, R.A. Hematotoxicity: chemically induced toxicity of the blood, In: WILLIAMS, P.L., JAMES, R.C., ROBERTS, S.M. (Eds.), **Principles of Toxicology - Environmental and Industrial Applications**, 2nd.ed. John Wiley & Sons Inc, New York, p. 87–109, 2000.

COLLIER, H.B. The standardizations of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v.50, p.550-552, 1944.

COSTA, D. V.; FERREIRA, M. W.; NAVARRO, R. D.; ROSA, P. V.; MURGAS, L. D. S. Parâmetros hematológicos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de óleo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, n.3, p.754-764, 2014.

DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, n.134, p.109-121, 2003.

ESTEVES, K.E.; ISHIKAWA, C.M. Características gerais e práticas de manejo em pescadores da região metropolitana de São Paulo. 2006. In: ESTEVES, K.E.; SANT'ANNA, C.L. (orgs.) **Pesqueiros sob uma Visão Integrada de Meio Ambiente, Saúde Pública e Manejo: Um Estudo da Região Metropolitana de São Paulo**. São Carlos: RiMa. p. 240, 2006.

FISHER, S. A.; HALL, L.W. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflubenzuron (Dimilin). **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 45-79, 1992.

FRIES, E. M.; HASSEMER, M. Z.; FINKLER, J. K.; MALUF, M. L. F.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R. Avaliação dos parametros hematologicos do pacu *Piaractus mesopotamicus* infectado por *lernea spp.* **Revista Cultivando o Saber**, v.9, n. 4, p.479-485, 2016.

FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MONFORT, K. C. F. Parâmetros sanguíneos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente em duas densidades de estocagem. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 29, n. 4, p. 465-471, 2007.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, n.1, p.35-39, 1971.

GUIMARÃES, A. T. B.; ASSIS, H. C. S.; BOEGER, W. The effect of ttichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.68, p.57-62, 2007.

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

HENARES, M. N. P.; CRUZ, C.; GOMES, G. R.; PITELLI, R. A.; MACHADO, M. R. F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do Diquate na brânquia e no fígado do Piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 107-116, 2007.

HINTON, D. E.; SEGNER, H.; AU, D. W. T.; KULLMAN, S. W., HARDMAN R. C. Liver Toxicity. In: Do Giulio & Hinton, D. E. **The Toxicology of Fishes**, (1071 p.), 2008.

KILDEA, M. A.; ALLAN, G. L.; HEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anesthetics clove oil and AQUI-S from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v.232, p.265-277, 2004.

KLEINOW, K. M.; NICHOLS, J. W.; HAYTON, W. L.; McKIM, J. M.; BARRON, M. G. Toxicokinetics in Fishes. In: GIULIO & HINTON, D. E. **The Toxicology of Fishes**. (1071 p.), 2008.

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

LANGFORD, K. H.; OXNEVAD, S.; SCHOYEN, M.; THOMAS, K. V. Do antiparasitic medicines used in aquaculture pose a risk to the norwegian aquatic environment. **Environmental Science & Technology**, v.48, p.7774-7780, 2014.

- LIMA, L. C.; HOLANDA, E. D.; RIBEIRO, L. P. Doença do sangue marrom em tilápias *Oreochromis* sp produzidas em recirculação. **Revista de Higiene e Sanidade Animal**, v.2, n.1, p.35-42, 2008.
- LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes com biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p.469-484, 2010.
- LOPES, R. B.; PARAIBA, L. C.; TORNISIELO, V. L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**, p. 56-62, 2006.
- LUVIZOTTO-SANTOS, R.; CORDEIRO, P. J. M.; VIEIRA, E. M. Analysis of Diflubenzuron in Tilapia Filet by HPLC-DAD. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, 2009.
- LUVIZOTTO-SANTOS, R.; ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; VIEIRA, E. M. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 343-358, 2009.
- MABILIA, R.G., SOUZA, S.M.G. Effect of the treatment with diflubenzuron in the hematology of jundiás *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infected by *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) in 24-hour immersion baths. **Acta Scientiarum**, v. 28, p.159–163, 2006.
- MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G.; OBERST, E. R. Efeito do banho de imersão de diflubenzuron no sêmen do jundiá *Rhamdia quelen* parasitado por *Lernaea cyprinacea*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, p. 661-666, 2008.
- MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 148, p. 265-272, 2008.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, p. 137-151. 2006.
- MARTINEZ, C. B. R. **Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água**. Universidade Estadual de Londrina, 2006.
- MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v.78, p. 294-299, 2010.
- MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A. The IGR Dimilin® and its formulations against mosquitoes. **Journal Economic Entomology**, v. 69, p.309-312, 1976.
- OSTRENSKY, A.; PESTANA, D.; CASTILHO, G. G.; BORGHETTI, J. R.; PEREIRA, L. A.; CHAMMAS, M.; PIE, M. R.; BOSCARDIN, N. R.; PILCHOWSKI, R. W.; SILVA, U. A. T.; BOEGER, W. A. **Aquicultura no Brasil: O Desafio é crescer**. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO, p.275, 2008.

PAIXAO, L. F.; SANTOS, R. F. B.; RAMOS, F. M.; FUJIMOTO, R. Y. Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (Osteichthyes: Characidae). **Acta Amazonica**, v. 43, n. 2, p.211-216, 2013.

PELLI, A.; PAULA, D. R.; ARRUDA, A. A. M.; LOPES, J. M.; RAMOS, S. M.; REZENDE, A. P. S. Toxicidade aguda e crônica de diflubenzuron para o jáu, *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821) (Pisces, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10, n. 1, p. 51-54, 2008.

PRIYA, R.; UMA, T.; SARAVANAN, N.; NARENDIRAN, N. J. Efficacy of detergent on hepatocyte morphological changes in fish, *Tilapia Mossambica*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.4, n. 5, p. 655-658, 2016.

QUENTEL C.; OBACH, A. The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus*. **Journal of Fish Biology**, v. 41,p. 709-716. 1992.

RAGHIANTE, F.; FERRASSO, M. M.; RODRIGUES, M. V.; BIONDI, G. F.; MARTINS, O. A. Hepatomegalia e esplenomegalia em *Oreochromis niloticus* cultivadas em sistema de tanques-rede. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, v. 4, p. 587-594, 2016.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica de peixes**. 1º Editora da Universidade Estadual de Maringá (142 pp.), 2013.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V.; MAIORINO, F. C.; GONÇALVES, A.; DIAS, D. C. Hematologia e histopatologia de tilápia-do-nilo exposta a concentrações sub-letais de selenito de sódio ($\text{Na}_2\text{SeO}_3\text{Se}^{4+}$). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.40, n.1, p.23-33, 2013.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. Haematology of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed graded levels of mannan oligosaccharides (MOS). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 1, p. 30-39, 2014.

SCHALCH, H. C. S. et al. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (osteichthyes: characidae) naturalmente infestados. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 297-302, 2005.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators the evaluated contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery** 6: p. 75–86, 1997.

SERIANI, R. & RANZANI-PAIVA, M.J.T. Alterações hematológicas em peixes: Aspectos fisiopatológicos e aplicações em ecotoxicologia aquática In: SILVA-SOUZA, A.T.; PEREZ LIZAMA, M. A.; TAKEMTO, R.M. (Org). **Patologia e sanidade de organismos aquáticos**. ABRAPOA, p. 221-242, 2012.

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE. **Aquicultura no Brasil: série de estudos mercadológicos**. SEBRAE/DF: Brasília, 2015. [on line] Disponível em:

[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2017.

SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C. Fatores estressantes em peixes. **Nutritime**, v. 6, n.4, p.1001-1017, 2009.

SILVA, R. D.; ROCHA, L. O.; FORTES, B. D. A.; VIEIRA, D.; FIORAVANTI, C. S. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.99-107, 2012.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n.2, p.429-431, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Relação hepatossomática e esplenossomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 273-281, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p. 103-110, 2003.

VELMURUGAN, B.; SELVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E. I. The effects of monocrotophos to different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.78, p.450-454, 2007.

WEXLER, P. Diflubenzuron. In: **Encyclopedia of Toxicology**, 2th ed., Elsevier: Amsterdã, p. 146-149, 2000.

WINTROBE, M. M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. **Foglia Haematology**, v.51, p. 32-49, 1934.

WOLF, J. C.; WOLFE, M. J. A brief Overview of Non-neoplastic hepatic Toxicity in Fish. **Toxicologic Pathology**, vol. 33, p. 75-85. 2005.

YOUNG, M.F., TROMBETTA, L.D., CARSON, S. Effects of diflubenzuron on the mouse liver. **Journal of Applied Toxicology**, v. 6, p. 343-348, 1986.

ZAIDI, N.; SOLTANI, N. Laboratory evaluation of environmental risk assessment of pesticides for mosquito control: toxicity of dimilin on a larvivorous fish, *Gambusia affinis*. **Advances in Environmental Biology**, p. 605-613, 2013.