

ANA CATARINA LUSCHER ALBINATI

**TOXICIDADE DO INSETICIDA TIAMETOXAM PARA PEIXES
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) E PACAMÃ
(*Lophiosilurus alexandri*)**

RECIFE – PE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

ANA CATARINA LUSCHER ALBINATI

**TOXICIDADE DO INSETICIDA TIAMETOXAM PARA PEIXES
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) E PACAMÃ
(*Lophiosilurus alexandri*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Pierre Castro Soares

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**TOXICIDADE DO INSETICIDA TIAMETOXAM PARA PEIXES
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) E PACAMÃ
(*Lophiosilurus alexandri*)**

Tese de Doutorado elaborada por
ANA CATARINA LUSCHER ALBINATI

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pierre Castro Soares
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Eduardo Luiz Trindade Moreira
Escola de Medicina Veterinária – UFBA

Prof^ª. Dr^ª. Emiko Shinozaki Mendes
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Ficha catalográfica

A335t

Albinati, Ana Catarina Luscher

Toxicidade do inseticida tiametoxam para peixes tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) / Ana Catarina Luscher Albinati. – Recife, 2016.

96 f.: il.

Orientador: Pierre Castro Soares.

Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.

Inclui referências e anexo(s).

1. Ecotoxicologia 2. Intoxicação 3. CL50 4. Contaminação ambiental I. Soares, Pierre Castro, orientador II. Título

CDD 636.089

*“Aos meus pais, meus irmãos, meus sobrinhos,
sem vocês não seria possível ...”*

*“ A Duca pela cumplicidade, pelos bons e pelos
difíceis momentos compartilhados nesse período”*

*“Aos meus filhos João e Miguel, que não fazem
idéia da dimensão da importância deles para
conclusão dessa etapa, com vocês, para vocês, por
vocês”*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me guiar e me dar oportunidades incríveis e colocar na minha vida pessoas mais que especiais!

Ao Professor Pierre Castro Soares, agradeço a imensa confiança em mim depositada durante todo esse período, por ter aceito o desafio de trabalhar com peixes, por ter me apoiado em todas as minhas decisões, me orientado e aconselhado nos momentos complicados desse percurso.

Ao Professor Eduardo Luiz Trindade Moreira, por ter aceito o convite para trabalharmos juntos mais uma vez, como meu co-orientador, sempre presente apesar da distância.

Ao Professor Ricardo Castelo Branco Albinati, que contribuiu enormemente nesse trabalho, cedendo as instalações do Lasoa (Laboratório de aquicultura e sanidade de organismos aquáticos) para execução do experimento, participando com a mão na massa de todas as etapas, mente pensante e executora e além disso como grande “paitrocinador”! Obrigada, Pai!

A Universidade Federal do Vale do São Francisco, em todas as suas instâncias administrativas em especial ao Colegiado de Medicina Veterinária, pela liberação integral e confiança.

Ao PGCAT, aos professores pelos ensinamentos, e aos coordenadores, em especial Prof^a Marleyne e Prof. Anísio, pela disposição e atenção que sempre tiveram comigo.

A Codevasf, fazenda de Bebedouro, Petrolina, pelos pacamãs cedidos.

Ao Cetene por proporcionar a realização da microscopia eletrônica de transmissão, em especial a Josy, Ceça, Gaby e Fábria pelo processamento do material e pela paciência e atenção nos diversos emails trocados. Ao Diego pelas fotos da MET.

A Cristiane Scavuzzi pela grande ajuda na etapa da MET e pela disposição em sempre ajudar no que fosse preciso.

Ao Prof. Valdemiro Júnior pela idéia de fazer a morfometria, pelas explicações e todo apoio para que essa etapa fosse concluída.

Ao Altemar e a Dona Eva, do laboratório de Patologia Veterinária da UFBA pelo processamento do material histopatológico.

A Marta, do laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário da UNIVASF, pelo auxílio nas análises bioquímicas.

As amigas do Lasoa, Alê, Jaci, Silene, Thainá que botaram literalmente a mão na água!

Aos colegas do PGCAT, pelos momentos de alegria e tensão divididos durante as disciplinas.

Aos queridos do laboratório de patologia veterinária da UFRPE, Simon, Fabi, Jéssica, André, Aluanan e Sandrinha, sempre dispostos a ajudar!

A minha mãe Fátima, a meu pai Ricardo, a minha irmã Mariana, a meu irmão Gabriel e aos meus sobrinhos lindos Theco e Bebeh, família mais que especial, sem vocês não teria sido possível concluir, e contar aqui o que cada um fez daria uma tese... dias e noites com meus filhos, viagens pra lá e pra cá, "positive vibrations" e até surf na piscina! Isso e muito mais pra eu poder fazer os experimentos, escrever, estudar... família amada! Sem palavras para agradecer!

Aos meus filhos João e Miguel que vivenciaram tão intensamente esse período, onde "doutorado" e "tese" já fazem parte do vocabulário! João: "mãe, deixa eu ir ler lâmina com voce?!" Eu: Tá fazendo o que aí, Miguel? Miguel: "Tô fazendo minha tese!". Vocês, meus pequeninos, trouxeram a leveza que o momento pedia. Amo vocês!

A Durval, meu amado marido, são tantos anos e tantas emoções... mas esses quatro últimos anos foram intensos, não?! E com muito amor, carinho e compreensão compartilhados, finalizamos essa etapa! Obrigada por tudo! Te amo!

A D. Olga e ao Sr. Durval (in memoriam), mesmo num momento tão complicado, sempre se fizeram presentes.

Ao casal amigo Ricardo e Gerlane, por terem nos acolhido como família, pelo apoio imensurável que nos deram todo esse período, por tudo! Vocês são muito mais que amigos!

Ao amigo Seldão, sempre disposto a ajudar em tudo! Por todo apoio profissional e familiar! pelas intensas discussões sobre bioquímica... Você é família, não tem pra onde fugir!

Aos amigos Ana, Alex, Cassete e Dani, pela torcida, pelo apoio moral, pelos momentos de descontração nos meses que antecederam a defesa, podem ter certeza que isso me deixou mais tranquila! Não se preocupem... vai ter churrasco!

Aos amigos queridos agradeço pelos diversos e diferentes tipos de apoio para a conclusão do doutorado!

Foram mais de 4 anos e muita coisa foi feita, difícil lembrar de todos que de alguma forma contribuiu para a finalização dessa etapa, desculpa se me esqueci de alguém, mas fica aqui com o mesmo carinho o meu muito obrigada!

A todos vocês o meu muito obrigada!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

TOXICIDADE DO INSETICIDA TIAMETOXAM PARA PEIXES TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) E PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri*)

O tiametoxam é um inseticida neonicotinóide usado em diversas culturas e classificado como perigoso para o meio ambiente. Objetivou-se com esta pesquisa estudar a toxicidade de um inseticida a base de tiametoxam (Actara 250WG®) para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Para tanto foram realizados 3 experimentos, o primeiro consistiu na determinação da CL50 para a tilápia do Nilo, no segundo, avaliou-se a toxicidade subletal (10%CL50) para tilápias juvenis, por meio de aspectos histopatológicos do fígado e alterações na bioquímica sérica. No terceiro experimento foi avaliada a toxicidade aguda e crônica para o pacamã por meio de aspectos histopatológicos do fígado. A metodologia usada no primeiro experimento foi a exposição de alevinos de tilápias a cinco diferentes concentrações (150, 300, 450, 600 e 750 mg/L) do inseticida por um período total de 96 horas, além de um grupo controle, com quantificação da mortalidade a cada 24 horas. No segundo experimento juvenis de tilápia foram expostas a 32 mg/L(10% CL50) do inseticida e um grupo controle por um período total de 360 horas, com 4 períodos amostrais (24, 96, 168 e 360 horas), nos quais foram feitas as coletas de sangue para análise bioquímica e fragmentos de tecido hepático para histopatologia e histomorfometria. No terceiro experimento foram utilizados alevinos de pacamã submetidos a cinco diferentes concentrações do inseticida (30, 60, 120, 240 e 480 mg/L) e um grupo controle por 15 dias, divididos em dois tempos amostrais, 96 horas e 15 dias, nesses períodos foram executadas as coletas de tecido hepático para histopatologia. Como resultado, foi determinado uma CL50 do Actara 250WG®, para alevinos de tilápias do Nilo de 322,08 mg/L. Na exposição a 10% da CL50, tilápias juvenis apresentaram diminuição da proteína total e aumento nos triglicerídios séricos, além de maior grau de severidade de necrose hepática e pancreática nos animais expostos ao inseticida em relação ao controle. Para o pacamã foi determinada CL50 como superior a 100 mg/L e evidenciou-se necrose hepática nos animais expostos, com o aumento do número de animais que apresentavam essa alteração após 15 dia de exposição. Para as duas espécies estudadas, o tiametoxam apresentou hepatotoxicidade.

Palavras-chave:CL50, histopatologia, bioquímica sérica, fígado, Actara, ecotoxicologia

ABSTRACT

THIAMETHOXAM TOXICITY FOR NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) AND PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri*) FISHES

The thiamethoxam is a neonicotinoid insecticide used in different cultures and classified as dangerous for the environment. The objective of this research was to study the toxicity of an insecticide thiamethoxam (Actara 250WG®) for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Therefore, we conducted three experiments, the first was the determination of LC50 for tilapia Nile, the second evaluated the sublethal toxicity (10% LC50) for tilapia juveniles through histopathological aspects of the liver and changes in serum biochemistry. In the third experiment evaluated the acute and chronic toxicity to pacamã through histopathological aspects of the liver. The methodology used in the first experiment was the exposure of fingerling tilapia to five different concentrations (150, 300, 450, 600 and 750 mg / L) of the insecticide for a total period of 96 hours, and a control group, with quantification of mortality every 24 hours. In the second experiment juvenile tilapia were exposed to 32 mg / L (10 % LC50) and a control group for 360 hours, 4 sampling periods (24, 96, 168 and 360 hours), to which were made the blood samples for biochemical analysis and liver tissue fragments for histopathology and histomorphometry. In the third experiment were used fingerling pacama submitted to five different concentrations of insecticide (30, 60, 120, 240 and 480 mg / L) and a control group for 15 days, divided into two sample days, 96 hours and 15 days, these periods were executed collections of liver tissue for histopathology. As a result, it was determined LC50 of Actara 250WG® to Nile tilapia fingerling of 322.08 mg / L. In exposure to 10% of LC50, juvenile tilapia demonstrated decrease total protein and increase in serum triglycerides and greater severity of liver and pancreatic necrosis in exposed animals. For pacama LC50 was determined as more than 100 mg / L and liver necrosis was evident in exposed animals with increasing occurrence after 15 day exposure. For both species, thiamethoxam showed hepatotoxicity.

Keywords: LC50, histopathology, serum biochemical, liver, actara, ecotoxicology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2. REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Exemplar de tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	22
Figura 2. Exemplar de pacamã (<i>Lophiosilurus alexandri</i>).....	23
Figura 3. Fórmula estrutural do tiametoxam.....	24

ARTIGO 1. Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do inseticida tiametoxam para alevinos de tilápia do Nilo

Figura 1. Variação do pH da água em função do tempo de exposição ao inseticida, para diferentes concentrações de Tiametoxam.....	49
Figura 2. Variação do Oxigênio Dissolvido (OD) na água em função do tempo de exposição ao inseticida, para diferentes concentrações de Tiametoxam.....	49
Figura 3. Mortalidade de alevinos de Tilápia do Nilo expostos a diferentes concentrações de Tiametoxam por 96 horas.....	50

ARTIGO 2. Parâmetros bioquímicos, histopatológicos e morfométricos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) expostos à concentração subletal do inseticida tiametoxam

Figura 1 – Perfil da análise de regressão, em função das horas, do número de hepatócitos mortos de peixes expostos ou não por inseticida Tiametoxam.....	65
Figura 2 - Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático de tilápias do Nilo expostos ao tiametoxam. Em A, extensa área de necrose (seta preta)(HE-obj 10x). Em B, tecido pancreático com infiltrado inflamatório	

mononuclear (seta vermelha)(HE – obj.40x). Em C, vacuolização grau 2 (HE - obj. 40x). Em D, vacuolização grau 2 sem reação ao PAS (PAS, obj. 40x). Em E, vacuolização grau 3 (HE – obj. 40x). Em F, vacuolização grau 3 com poucas áreas positivas ao PAS (seta amarela) (PAS, obj.40x). * - veia central..... 66

ARTIGO 3. Toxicidade do inseticida Tiametoxam para o Pacamã (*Lophisilurus alexandri*)

Figura 1. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático com diferentes graduações de vacuolização (obj. 40x). Em A, vacuolização grau 1 referente a animal do grupo controle 96 horas (HE); em B, controle 96 horas, vacuolização grau 1 demonstrando reação positiva ao PAS (seta amarela) (PAS); em C, animal exposto ao T1 por 96 horas, apresentando vacuolização grau 2 (HE), em D, animal exposto ao T1, vacuolização grau 2 demonstrando reação positiva ao PAS; em E, animal exposto ao T5 por 15 dias, apresentando vacuolização grau 3 (HE); em F, animal exposto ao T5 por 15 dias, vacuolização grau 3, demonstrando a fraca reação ao PAS (granulações). Seta amarela - área de reação positiva ao PAS. Asterisco (*) – veia central..... 85

Figura 2. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático de pacamã expostos ao tiametoxam por 15 dias. Em A, extensa área de necrose (seta preta) com presença de hemácias (*) (HE, obj.10x). Em B, área de necrose com presença de núcleos picnóticos (seta amarela) (HE, obj.40x)..... 86

Figura 3. Distribuição da frequência absoluta de necrose hepática em pacamãs expostos ao tiametoxam por 96 horas e 15 dias..... 86

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1. Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do inseticida tiametoxam para alevinos de tilápia do Nilo

Tabela 1. Concentração Ambiental estimada e Quociente de Risco para Tilápia do Nilo 52

ARTIGO 2. Parâmetros bioquímicos, histopatológicos e morfométricos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) expostos à concentração subletal do inseticida tiametoxam

Tabela 1. Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (*p*) dos fatores de variação de parâmetros bioquímicos do sangue do perfil proteico de Tilápia do Nilo expostos ou não por inseticida Tiametoxam..... 63

Tabela 2. Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (*p*) dos fatores de variação de parâmetros bioquímicos do sangue do perfil energético e atividade enzimática de Tilápia do Nilo expostos ou não por inseticida Tiametoxam..... 64

Tabela3. Distribuição percentual e absoluta das alterações hepáticas de acordo com o grupo, o tempo e a graduação..... 67

Tabela 4. Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (*p*) dos fatores de variação da contagem de hepatócitos mortos do fígado de Tilápia do Nilo expostos ou não por inseticida Tiametoxam..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL50	- Concentração letal 50%
CAE	- Concentração ambiental estimada
QR	- Quociente de Risco
OD	- Oxigênio dissolvido
HE	- Hematoxilina eosina
PAS	- Ácido periódico de Schiff
ALT	- Alanina aminotransferase
AST	- Aspartatoaminotransferase
FA	- Fosfatase Alcalina
LDH	- Lactato desidrogenase

FONTES FINANCIADORAS

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) -
bolsa de doutorado (IBPG -0903-5.05/11).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 O impacto do uso de agrotóxicos no ambiente.....	19
3.2 Espécies de peixes.....	21
3.2.1 Tilápia do Nilo.....	22
3.2.2 Pacamã.....	23
3.3 O inseticida tiametoxam.....	23
3.4 Testes de toxicidade.....	26
3.5 Parâmetros bioquímicos.....	30
3.6 Histopatologia e Morfometria.....	32
4. REFERÊNCIAS.....	33
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	43
Artigo 1. Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do inseticida tiametoxam para alevinos de Tilápia do Nilo.....	44
Artigo 2. Parâmetros bioquímicos, histopatológicos e morfométricos de tilápias do nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) expostos à concentração subletal do inseticida tiametoxam.....	57
Artigo 3. Toxicidade do inseticida Tiametoxam para o Pacamã (<i>Lophisilurus alexandri</i>).....	78
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
7. ANEXOS.....	88

1 INTRODUÇÃO

No modelo agrícola atual, os agrotóxicos são tidos como indispensáveis, sendo também um dos principais poluentes químicos que se difundem pelo planeta (Grisolia, 2005). Na última década, o mercado de agrotóxicos no Brasil expandiu rapidamente, num ritmo muito maior do que o apresentado pelo mercado mundial, levando o Brasil a alcançar a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos desde 2008 (Londres, 2011; Rigotto, 2014). A frequência de uso também é maior que a média verificada em países de altas latitudes, em função do clima e dos métodos agrícolas utilizados (Grazziero, 2015). Apesar de úteis na agricultura, a sua ampla utilização tem perturbado o meio ambiente e organismos importantes ao ecossistema (Uğurlu, 2015).

A base dos estudos de Toxicologia Aquática é formada pelo desenvolvimento principalmente de dois testes experimentais, os de toxicidade aguda e de toxicidade crônica. Os testes de toxicidade aguda proporcionam rápidas respostas na estimativa dos efeitos letais de um agente tóxico sobre organismos aquáticos. Compreendem análises experimentais de curta duração (24-96 horas), que visam determinar a concentração letal média (CL50). Os testes de toxicidade aguda geram dados que servem de base para a elaboração de outros estudos subseqüentes, como os testes de toxicidade crônica e avaliações de risco ecotoxicológico (Lombardi, 2004).

A capacidade de um pesticida causar danos aos peixes e a outros animais aquáticos está ligada à sua toxicidade, tempo de exposição, dose e persistência no ambiente. Nem todos os pesticidas provocam morte imediata dos peixes e doses subletais podem causar mudanças comportamentais, perda de peso, queda na resistência e redução da resposta imunológica, dentre outros problemas (Helfrich et al., 1996). Peixes são relativamente sensíveis a mudanças no ambiente e efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em nível celular e tecidual, antes que mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa possam ser identificadas (van Dyk, 2005).

As alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente podem ser usadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes, sugerir as relações de causa-efeito entre a exposição aos

contaminantes e os efeitos observados no organismo e documentar os efeitos integrados do estresse químico nos peixes, atuando como biomarcadores da contaminação aquática. Estes biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas de monitoramento ambiental (Walker et al., 1996). A presença de um composto xenobiótico por si só, não indica efeitos danosos, portanto conexões devem ser estabelecidas entre a presença do poluente e seus efeitos deletérios sobre o ecossistema (Pampanin, 2006).

Alterações histológicas em tecidos de peixes constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (Schwaiger et al., 1997). Lins (2010) ressalta que órgãos de contato direto com o agente agressor, como as brânquias e os órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos – como o fígado e o rim, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais.

O tiametoxam é um inseticida neonicotinóide de segunda geração que apresenta classificação toxicológica III (medianamente tóxico) e classe ambiental III (perigoso para o meio ambiente). O mecanismo de ação do Tiametoxam é por ligação nos receptores nicotínicos da acetilcolina (Maiennfisch, 2001). Essa nova geração de inseticidas veio substituir os organofosforados e carbamatos, os quais tem diminuído a sua eficiência devido a resistência dos insetos, ou ainda, sendo menos utilizados considerando o aumento das restrições de seu uso, levando em consideração os aspectos toxicológicos no campo (Tavares, 2011).

De acordo com levantamento realizado por Scorza Jr e Rigatano (2012) a existência de alguns estudos sobre a degradação, sorção e lixiviação do tiametoxam nas condições edafoclimáticas brasileiras, demonstram a alta persistência e intensa lixiviação nos solos. Em estudo realizado por Silva et al.(2014), foi demonstrado que o tiametoxam é moderadamente persistente no solo e tem alto potencial de transporte quando dissolvido em água.

Os produtos a base de tiametoxam são utilizados em diversas culturas como: abacaxi, abobrinha, alface, arroz, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, citros, feijão-vagem, fumo, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, repolho, tomate e uva (Agrofit, 2012). Além do uso agrícola, o tiametoxam tem sido

prospectado para o uso em aquicultura, de acordo com Carraschi *et.al* (2014), o produto apresenta alta eficácia no controle do parasita *Anacanthor penilabiatus* em Pacus.

Pouco se sabe sobre a toxicidade do tiametoxam para os organismos de água doce não-alvo e seu potencial efeito nos ecossistemas de água doce (Uğurlu, 2015). Alguns autores consideram o Tiametoxam praticamente não tóxico para peixes (Maeinfisch, 2001), no entanto, ainda são poucos os estudos realizados sobre os efeitos do tiametoxam com esses animais. Carraschi et al.(2015) estudando os riscos ambientais e ecotoxicologia do tiametoxam sobre pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e mato-grosso (*H. eques*) concluiu que o produto é ligeiramente tóxico para as espécies estudadas e que existe um risco de intoxicação ambiental.

Bose et al. (2011) observaram que em tilápias do Nilo expostas a doses subletais de tiametoxam ocorreu um impacto significativo no crescimento dos animais e distúrbios hematológicos foram observados por Roy e Nath (2011). Neste contexto, torna-se importante o estudo dos efeitos do tiametoxam em peixes e para isso optou-se pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie exótica mais cultivada no Brasil e o Pacamã, espécie nativa do Rio São Francisco, região onde o inseticida tem ampla utilização (Bedor, 2007).

2. OBJETIVOS:

Geral:

Avaliar a toxicidade aguda e crônica de um inseticida a base de tiametoxam em peixes das espécies Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e Pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) através de parâmetros bioquímicos e histopatológicos.

Específicos:

Determinar a CL₅₀ (concentração letal 50%) do tiametoxam para Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e Pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*).

Avaliar o tecido hepático quanto ao aspecto histopatológico no teste de toxicidade aguda e de toxicidade crônica com o tiametoxam para as duas espécies.

Avaliar perfil bioquímico de tilápias do Nilo submetidas a testes de toxicidade aguda e crônica com o tiametoxam.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão dissertamos sobre os aspectos gerais do impacto de agrotóxicos sobre o ambiente aquático, discorrendo sobre as espécies de peixes utilizadas nesse estudo, o inseticida avaliado, os testes de toxicidade e por fim os parâmetros utilizados para avaliar a toxicidade do produto estudado para as espécies em questão.

3.1 O impacto do uso de agrotóxicos no ambiente aquático

Existem centenas, talvez milhares de poluentes que afetam o ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes. Esse número cresce anualmente, considerando-se que novos compostos e formulações são sintetizados. A poluição aquática está comumente associada à descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas. Em áreas agrícolas, a lixiviação de águas superficiais e a infiltração da água intersticial para rios e lagos podem introduzir nutrientes e agrotóxicos, em quantidades substanciais, nesses corpos d'água. Os efeitos deste tipo de poluição podem ser sérios, mas frequentemente são menos óbvios que aqueles de poluição originada em focos pontuais (Martinez e Cólus, 2002).

Uma das questões mais importantes em relação à utilização de agentes tóxicos nos trópicos refere-se ao uso indiscriminado de agroquímicos. A agroindústria brasileira utiliza uma ampla variedade de fungicidas, herbicidas e inseticidas, incluindo alguns que já foram proibidos em outros países (Martinez e Cólus, 2002; Londres, 2011). No modelo agrícola atual, os agrotóxicos são tidos como indispensáveis, sendo também um dos principais poluentes químicos que se difundem pelo planeta (Grisolia, 2005). Os agrotóxicos são considerados os contaminantes aquáticos mais graves decorrentes das atividades antropogênicas, justamente pelo fato de serem desenvolvidos para eliminar formas de vida e, dessa maneira atingirem também, de modo letal, espécies não-alvo (Grisolia, 2005).

As emissões de fontes pontuais são mais facilmente detectadas e controladas e geralmente resultam de descargas diretas dos contaminantes nos corpos d'água, ao contrário, as fontes não pontuais são de difícil controle e variam com o tempo e espaço podendo envolver rotas que resultam em deposição parcial dos contaminantes antes de chegarem aos corpos d'água, e um exemplo clássico de poluição não pontual é o uso de agrotóxicos nos solos (Costa et al, 2008).

Os agrotóxicos são um dos grupos mais estudados de contaminantes ambientais. Eles diferem de outros produtos químicos uma vez que a sua finalidade é exibir atividade biológica e em função disso são esperados possíveis efeitos sobre organismos não-alvo. Como consequência, eles têm um rico banco de dados toxicológicos e ecotoxicológicos porque para a autorização de uso é exigido uma avaliação de risco formal. No entanto, existe a preocupação com potenciais efeitos ambientais e para humanos, particularmente após a exposição a longo prazo a níveis baixos (Baltazar et al., 2014).

Apesar de ser exigido dados físico-químicos, ambientais e toxicológicos pelos órgãos reguladores no processo de registro de agrotóxicos, ainda restam muitas incertezas no que diz respeito aos impactos do uso destas substâncias sobre a saúde humana e o meio ambiente (Gomes e Barizon, 2014). O monitoramento e a avaliação dos impactos do uso destas substâncias devem ser vistos como atividades essenciais para garantir a sustentabilidade dos sistemas de produção agropecuários que utilizam tais insumos (Oliveira, 2005).

Na última década o uso de agrotóxicos no Brasil assumiu proporções assustadoras, alcançando a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos, tendo ultrapassado a marca de 1 milhão de toneladas em 2009 (Londres, 2011).

No Brasil, a região do submédio São Francisco tem se destacado como uma das principais áreas de exploração e exportação da hortifruticultura irrigada do país, tendo mais de 51% da sua população economicamente ativa empregada na agricultura. A produção de manga e uva irrigadas aparecem como principais monoculturas na região e são exploradas por grandes e pequenos agricultores. Devido ao tipo de produção predominante, a principal classe de agrotóxicos utilizada na região é a inseticida (56%), seguida pelos fungicidas (30%), os herbicidas (7%), os reguladores de crescimento

(4%), os acaricidas (2%) e os formicidas (1%). Entre os agrotóxicos mais vendidos na região está o Actara, um inseticida a base de tiametoxam (Bedor, 2007).

A alta produtividade da videira na região do Vale do São Francisco tem dado destaque a essa região, no entanto, por se tratar de uma monocultura, cultivada em grandes extensões, necessita do uso constante de agrotóxicos e fertilizantes para garantir essa produtividade, e dependendo da quantidade, do tipo e da forma como são utilizados, podem contribuir com a contaminação das águas superficiais e subterrâneas (Silva et al., 2014), aliado a isso está o descarte dos efluentes contaminados com agrotóxicos originados das sobras de caldas de pulverização e lavagem de equipamentos que tem sido um problema ambiental para a região (Amorim, Júnior et al., 2014).

A intensificação dos impactos ambientais sobre a ictiofauna da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco deve ser estancada e revertida em ações práticas de revitalização, que devem ter início pelo controle das atividades potencialmente danosas e, posteriormente, por ações práticas de conservação e de manejo (Alves et al., 2011).

3.2 Espécies de peixes

A utilização de invertebrados no monitoramento ambiental é comum, no entanto, o número de trabalhos empregando peixes como bioindicadores de qualidade dos ecossistemas aquáticos é crescente (Benjamim, 2014). Para a escolha do organismo-teste alguns critérios de seleção podem ser usados: abundância e disponibilidade, significativa representação ecológica, conhecimento da biologia, fisiologia e hábitos alimentares, estabilidade genética e uniformidade de populações, baixo índice de sazonalidade, sensibilidade constante e apurada, importância comercial, facilidade de cultivo em laboratório, e se possível, a espécie deve ser nativa para a melhor representatividade dos ecossistemas (Rand e Petrocelli, 1995).

Entre as espécies aquáticas, os peixes são os principais alvos de contaminação de agentes tóxicos e por isso estão sendo amplamente utilizados para a avaliação da qualidade do ambiente aquático e, como tal pode servir como bioindicadores de poluição ambiental (Firat, 2011).

3.2.1. Tilápia do Nilo

A Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe pertencente à família Cichlidae e originário do continente africano, nas bacias dos rios Nilo, Níger, Chade e nos lagos do centro-oeste e que já foi introduzida em mais de 100 países de climas tropicais e subtropicais (Vicente et al., 2014).

A tilápia-do-Nilo é considerada um exemplar exótico e foi introduzida inicialmente no Brasil pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) em 1971. Trata-se de uma espécie onívora que aceita com facilidade vários tipos de alimento, dócil ao manejo em todas as fases de cultivo, boa rusticidade, prolífica e de fácil domínio da reprodução (Tavares-Dias et al. 2000). Sua produção cresce a cada ano, e atualmente é o principal peixe em aquacultura no país (Vicente et al., 2014).

O uso da tilápia como modelo para estudos toxicológicos é válido devido as características apresentadas como rápido crescimento, adaptabilidade a dietas variadas, alta resistência a doenças, práticas de manejo, fácil reprodução e em cativeiro, e adequada resistência a uma ampla variedade de condições ambientais (Fontainhas-Fernandes, 1998).



Figura 1. Exemplar de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

3.2.2. Pacamã

O Rio São Francisco contém em sua fauna inúmeras espécies de peixes com importância ambiental, social e econômica, seja nas próprias comunidades ribeirinhas, seja em todo o território nacional, uma dessas espécies nativas é o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) (Campeche et al., 2011).

O pacamã é um peixe carnívoro pertencente à Classe Actinopterygii; Ordem Siluriformes; família Pseudopimelodide; Gênero *Lophiosilurus*. Conhecido ainda como pocomã, pacamão, niuim ou ainda, linguado do- São-Francisco (Reis et al., 2003). Esta entre os bagres de maior interesse para aquicultura por apresentar carne com excelente sabor e poucos ossos, além de ser utilizada em programas de repovoamento em reservatórios (Shibatta, 2003; Luz et al., 2011), e ser comercializado como peixe ornamental, fatos que reforçam ser essa uma espécie com potencial para criação comercial (Campeche, 2011). Além de ser um peixe que aceita com certa facilidade o alimento inerte, ocorrendo a substituição do alimento vivo sem maiores problemas (Luz et al., 2007).

Apresenta o corpo achatado dorso-ventralmente, coloração marrom pardacenta na face dorsal com máculas pequenas, olhos muito pequenos e mandíbula prognata (Britski et al., 1988). É uma espécie sedentária (Barros et al., 2007) e prefere ambientes lênticos e arenosos (Sato et al., 2003).



Figura 2. Exemplar de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

3.3 O inseticida tiametoxam

Desde a sua descoberta no final de 1980, os neonicotinóides tornaram-se a classe inseticida mais utilizada no mundo, com aplicações que vão desde a proteção de plantas,

produtos veterinários, e biocidas para o controle de pragas de invertebrados em piscicultura (Delso et al, 2015). O tiametoxam é um inseticida neonicotinóide de segunda geração cujo mecanismo de ação é por ligação nos receptores nicotínicos da acetilcolina (Maiennfisch, 2001). Essa nova geração de inseticidas, veio substituir os organofosforados e carbamatos, os quais tem diminuído a sua eficiência devido a resistência dos insetos, ou ainda, sendo menos utilizados considerando o aumento das restrições de seu uso, levando em consideração os aspectos toxicológicos no campo (Tavares, 2011).

Os produtos comerciais com o ingrediente ativo tiametoxam são comercializados pela Syngenta Proteção de Cultivos LTDA com os seguintes nomes comerciais: Actara 10 GR, Actara 250 WG, Actara 750 SG, Adage 350 FS , Adage 700 WS , Centric, Cruiser 350 FS , Cruiser 700 WS e Memory, a maioria com classificação toxicológica III (medianamente tóxico) e classe ambiental III (perigoso para o meio ambiente), com exceção do Actara 750 SG, Centric e Memory, que apresentam classificação toxicológica II (altamente tóxico). Além desses produtos formulados, existem outros produtos onde o tiametoxam aparece em associação a outros ingredientes ativos (Agrofit, 2016).

De acordo com o índice monográfico da ANVISA, o tiametoxam apresenta nome químico (3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5] oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina), com fórmula bruta $C_8H_{10}ClN_5O_3S$ e a seguinte fórmula estrutural:

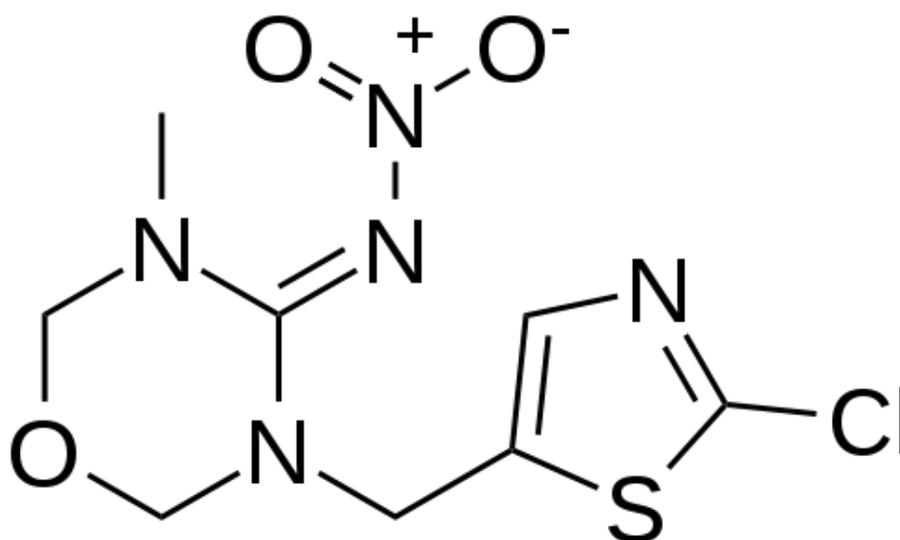


Fig 3. Fórmula estrutural do Tiametoxam

O tiametoxam é autorizado para uso agrícola em diferentes modalidades de emprego, aplicação no solo nas culturas de abacaxi, abobrinha, alface, arroz, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, citros, feijão-vagem, fumo, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, repolho, tomate e uva. Aplicação em sementes de algodão, amendoim, arroz, batata, cevada, feijão, girassol, milho, pastagem, soja, sorgo e trigo. Aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, alho, alho-porró, agrião, amendoim, arroz, aveia, batata, cana-de-açúcar, cebola, cebolinha, cevada, citros, coentro, crisântemo, ervilha, feijão, figo, fumo, girassol, mamão, mandioca, manga, melancia, melão, milho, morango, palma forrageira, pastagem, pepino, pimentão, repolho, rosa, soja, sorgo, tomate, trigo e uva.

Aplicação no tronco de citros. Aplicação por imersão de pedúnculos de abacaxi e de mudas de eucalipto. Aplicação no solo, em sulco de plantio e através de tratamento industrial de propágulos vegetativos (mudas) antes do plantio na cultura de cana-de-açúcar e aplicação em sulco de plantio na cultura de milho (Anvisa, 2016). Além do uso para controle de insetos em diferentes culturas, Carraschi (2011) citou o produto como potencial terapêutico para controle de ectoparasitas em aquicultura.

De acordo com levantamento realizado por Scorza Jr e Rigatano (2012) a existência de alguns estudos sobre a degradação, sorção e lixiviação do tiametoxam nas condições edafoclimáticas brasileiras, demonstram a alta persistência e intensa lixiviação nos solos. Considerando-se as características do clima e do solo da região do Submédio do São Francisco e por se tratar de área irrigada, os riscos de contaminação das águas superficiais e subterrâneas não podem ser desprezados. Somam-se a este fator de risco as características físicas dos solos da região (predominantemente areias quartzosas, podzólicos, latossolos vermelho-escuro, latossolos vermelho-amarelo e vertissolos) que propiciam a lixiviação dos agrotóxicos para camadas mais profundas, favorecendo contaminações subterrâneas e superficiais (Ferracini, 2001).

Alguns autores consideraram o tiametoxam praticamente não tóxico para peixes (Maeinfisch, 2001), no entanto, ainda são poucos os estudos realizados sobre os efeitos do tiametoxam em peixes, em especial em espécies nativas do Brasil. Carraschi (2011) estudando os riscos ambientais e ecotoxicologia do tiametoxam sobre pacus (*Piaractus mesopotamicus*), concluiu que o produto é ligeiramente tóxico para a espécie estudada, que existe um risco de intoxicação ambiental e que a presença do tiametoxam diminui o

oxigênio dissolvido na água. Bose et.al., (2011) observaram que em tilapias do Nilo expostas a doses subletais de tiametoxam ocorreu um impacto significativo no crescimento dos animais e distúrbios hematológicos foram observados por Roy e Nath, 2011.

3.4 Testes de toxicidade

A avaliação do impacto do uso de agrotóxicos sobre organismos não-alvo é realizada por meio de um elenco de testes. São considerados, em tais testes, organismos representativos dos principais grupos que sofrem a ação tóxica desses compostos, como pequenos mamíferos e pássaros, microorganismos do solo, insetos polinizadores, como as abelhas e as vespas, e organismos aquáticos, como peixes, zooplâncton, fitoplâncton e microcrustáceos (Grisolia, 2005).

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, para tanto, organismos-testes são expostos a diferentes concentrações da substância estudada e os efeitos tóxicos produzidos são observados e quantificados (Costa et al, 2008). A ecotoxicologia aquática avalia o efeito de substâncias tóxicas sobre organismos do ecossistema aquático (Rand et al, 1995) e são testes bastante utilizados uma vez que os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptores de contaminantes (Benjamim, 2014). Os testes ecotoxicológicos para monitoramento e avaliação da qualidade da água, tem se tornado bastante comuns nos últimos anos no Brasil (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

Os testes de toxicidade para peixes surgiram primeiramente na Grã-Bretanha nas décadas de 1920 e 1930, onde os peixes eram expostos a águas de drenagem de minas de chumbo e zinco. Na década de 1940 surgiram os primeiros estudos recomendando o uso de testes com peixes para avaliar a toxicidade de despejos industriais. Somente na década de 1960, os testes de toxicidade aguda foram padronizados dentro de metodologias em Toxicologia Aquática (Bertoletti, 1990). No Brasil, a primeira iniciativa em termos metodológicos aconteceu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da International Organization for Standardization (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do

estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (Zagatto e Bertolletti, 2006).

Os Testes de toxicidade são ferramentas desejáveis para avaliar a qualidade das águas, uma vez que somente a quantificação de parâmetros físico-químicos não são capazes de revelar as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as inertes no ambiente e com isso avaliar o risco ambiental dos contaminantes. As análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas e os testes de toxicidade avaliam os efeitos sobre sistemas biológicos, portanto, as duas análises se complementam (Costa et al, 2008). Somente os resultados de análises químicas não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes porque não demonstram os efeitos sobre o ecossistema. Somente os sistemas biológicos podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

A base dos estudos de Toxicologia Aquática é formada pelo desenvolvimento principalmente de dois testes experimentais, os de toxicidade aguda e o de toxicidade crônica (Lombardi, 2004). Para adquirir conhecimentos sobre os efeitos dos agentes químicos para a biota aquática, têm sido utilizados testes de toxicidade com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e/ou de campo. Esses testes possibilitam estabelecer limites permissíveis para várias substâncias químicas e, ainda, avaliar o impacto de misturas de poluentes sobre os organismos aquáticos dos corpos hídricos receptores (Bertolletti, 1990).

Os testes de ecotoxicidade detectam a capacidade inerente de um agente tóxico ou uma mistura em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, permitindo avaliar em que medida as substâncias são nocivas, como e onde se manifestam os efeitos (Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

Segundo Rand e Petrocelli (1985), a caracterização dos efeitos tóxicos de substâncias químicas e de outras substâncias antropogênicas nos organismos aquáticos pode se dar pela mortalidade (efeito letal), por alterações no crescimento, no desenvolvimento e na reprodução e pela presença de fenômenos patológicos, bioquímicos e fisiológicos (efeitos subletais). De acordo com esses mesmos autores, pode-se encontrar, sob a denominação de bioensaios, diversas modalidades de testes, como teste de toxicidade aguda, de toxicidade crônica, de biodegradação e de

bioacumulação, além dos testes subletais, que podem ser resumidos em três grupos básicos: bioquímicos / fisiológicos, histológicos e comportamentais.

Os testes de toxicidade aguda proporcionam rápidas respostas na estimativa dos efeitos letais de um agente tóxico sobre organismos aquáticos. Compreendem análises experimentais de curta duração (24-96 horas), que visam determinar a concentração letal média (CL50), que é definida como a concentração do agente tóxico que causa mortalidade de 50% na população dos organismos submetidos ao teste. O índice exato de 50% de mortalidade dificilmente pode ser atribuído com precisão a uma determinada concentração testada, este valor deve ser estimado através de análise gráfica da curva de mortalidade e/ou, principalmente, através de métodos estatísticos desenvolvidos para isso.

Os testes de toxicidade crônica simulam a situação ambiental na qual o organismo é exposto, durante longos períodos de tempo, a baixas concentrações de um agente tóxico, para o estudo de efeitos não letais, geralmente abordam apenas uma fase do ciclo de vida que pode variar de sete dias a meses (Lombardi, 2004).

Os efeitos agudos, no ambiente aquático, provocados por agentes tóxicos em organismos, podem ocorrer como resultado de aplicações inadequadas de agrotóxicos, acidentes ambientais, efluentes industriais não tratados lançados em corpos d'água receptores. O fato de uma substância química não produzir efeitos tóxicos em testes de toxicidade aguda não indica que não seja tóxica para os organismos testados. Os testes de toxicidade crônica permitem avaliar efeitos tóxicos de exposições prolongadas a doses sub-letais, que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que podem afetar suas funções biológicas (Costa et al, 2008).

Para os testes de toxicidade aguda existem três tipos de sistema: sistema estático, onde não há renovação da solução teste; sistema semi-estático, com renovação periódica da solução; e o sistema de fluxo contínuo, com renovação contínua da solução teste (Machado, 1999). Os testes de toxicidade aguda geram dados que servem de base para a elaboração de outros estudos subseqüentes, como os testes de toxicidade crônica e avaliações de risco ecotoxicológico (Lombardi, 2004).

Saliente-se que as concentrações subletais de produtos tóxicos no ambiente aquático não necessariamente resultam em mortalidade imediata dos organismos, entretanto elas têm significantes efeitos sobre os indivíduos, podendo provocar

inúmeros distúrbios fisiológicos. Os efeitos subletais muitas vezes se manifestam atingindo as estruturas celulares do organismo, de forma molecular e bioquímica, ou mesmo o próprio material genético (Ferreira, 2004).

A análise estatística desempenha papel importante na análise e interpretação dos resultados obtidos nos testes de toxicidade. Dentre os métodos para determinar CL50 encontram-se o método Probit, o método Logit e os métodos Spearman-Kärber e trimmed Spearman-Kärber (APHA,1998). Os dois primeiros são métodos paramétricos e não válidos para curvas dose-resposta assimétricas. Os outros dois métodos são não paramétricos que tem boas propriedades estatísticas, recomendados para cálculos precisos de CL50 com intervalo de confiança de 95% e são válidos para curvas dose-resposta simétricas assimétricas (APHA,1998; Hamilton,1977).

A capacidade de um pesticida causar danos aos peixes e a outros animais aquáticos está ligada à sua toxicidade, tempo de exposição, dose e persistência no ambiente. Nem todos os pesticidas provocam morte imediata dos peixes e doses subletais podem causar mudanças comportamentais, perda de peso, queda na resistência a temperaturas extremas e redução da resposta imunológica, dentre outros problemas (Helfrich et al., 1996).

As alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente podem ser usadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes, sugerir as relações de causa-efeito entre a exposição aos contaminantes e os efeitos observados no organismo e documentar os efeitos integrados do estresse químico nos peixes, atuando como biomarcadores da contaminação aquática. Estes biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas de monitoramento ambiental (Walker et al, 1996). Os contaminantes podem manifestar seus efeitos nos peixes em vários níveis de organização como: alterações estruturais em órgãos e tecidos, transtornos fisiológicos e modificações que podem prejudicar o crescimento e a reprodução (Adams, 1990).

3.5 Parâmetros bioquímicos

Muitas mudanças fisiológicas que ocorrem em resposta a distúrbios ambientais vêm sendo utilizadas rotineiramente para avaliar o estado de estresse em peixes. Essas respostas ao estresse são identificadas através de várias alterações, incluindo as respostas comportamentais, variáveis hematológicas e principalmente os marcadores bioquímicos. (El-Sayed et al., 2007).

Alterações no nível bioquímico oferecem vantagens como biomarcadores considerando-se que são usualmente as primeiras respostas passíveis de serem quantificadas e detectadas. Vários parâmetros bioquímicos de peixes tem sido utilizados como biomarcadores devido as suas respostas a substancias tóxicas (Martinez, 2006).

As respostas primárias de estresse em peixes incluem algumas mudanças hormonais, em particular os níveis de cortisol e catecolaminas circulantes. As respostas secundárias, que podem ou não serem causadas diretamente pela resposta endócrina, incluem alterações na glicose sanguínea, ácido láctico, íons, níveis teciduais de glicogênio. As respostas terciárias, incluindo alterações no crescimento, resistência a doenças e comportamento, podem resultar direta ou indiretamente destas respostas primárias e secundárias (Barton, 2002).

Qualquer mudança no ambiente externo pode provocar uma disfunção no sangue e conseqüentemente ter efeitos graves sobre atividades fisiológicas, tais como a resistência à doença, metabolismo, reprodução e desempenho. Estas alterações nos componentes sanguíneos podem ser utilizadas como indicadores de diagnóstico (Fagbuaro, et al., 2016).

As mudanças no perfil bioquímico refletem no metabolismo e em processos celulares do organismo, resultantes dos efeitos de vários poluentes, agentes estressores e patógenos, tornando possível estudar os mecanismos dos efeitos destas influências externas (Lusková et al., 2002). A avaliação da bioquímica do sangue na aquicultura também é promissora, uma vez que expressa correlação com a qualidade da água, doenças infecciosas e exposição a poluentes (Chen et al., 2003).

Os metabólitos (colesterol, glicose, proteínas totais, triglicerídeos) estão relacionados com a capacidade funcional dos órgãos, por isso os testes são direcionados para produtos de metabolismo final (El-Sayed et al., 2007). Glicose sanguínea é uma

importante fonte de energia para muitas células e é normalmente mantida pela quebra de carboidratos da dieta e por um complexo sistema de produção endógena (Fagbuaro, et al., 2016). Estes metabólitos de alta influência estressora podem ser utilizados em conjunto com a análise de enzimas para avaliar o estado clínico e produtivo do animal (Mattioli, 2014)

Várias enzimas solúveis do soro sanguíneo tem sido consideradas como indicadores relevantes de estresse, portanto, níveis séricos de ALT, AST, FA, e LDH tem sido comumente usadas no diagnóstico de doenças de peixes, bem como na detecção de danos teciduais causados pela poluição ambiental (Firat, 2011). O aumento da atividade da enzima ALT pode ser relacionado a mudanças na estrutura histológica de tecidos hepáticos e extrahepáticos (El-Sayed et al., 2007). A dosagem de enzimas plasmáticas tem um diagnóstico potencial na toxicologia e patologia de peixes, porque a atividade dessas enzimas pode informar sobre danos celulares em órgãos específicos. O fígado é rico em aspartato aminotransferase (AST) e mudanças nos níveis plasmáticos dessa enzima podem ser indício de uma disfunção hepática (Melo, 2008).

De um modo geral, os resultados da ALT, AST, FA, e LDH indicam alterações degenerativas e hipofunção do fígado. Como os efeitos tóxicos sobre os hepatócitos são sob a forma de danos teciduais, logo, as enzimas celulares são liberadas a partir das células para o soro sanguíneo. Portanto, o aumento de atividade enzimática no soro é principalmente devido à saída destas enzimas do citosol do hepatócito para a corrente sanguínea, como resultado de danos no fígado o que dá uma indicação do efeito hepatotóxico (Firat, 2011).

Portanto, alterações em parâmetros séricos podem ser resultado de dano a um tecido alvo (fígado, brânquias, e rim) e disfunção induzida por substâncias tóxicas, podendo esses parâmetros serem utilizados como indicadores rápidos e sensíveis de monitorização em relação a impacto das substâncias tóxicas nos organismos aquáticos e em todo o ecossistema (Firat, 2011).

3.6 Histopatologia e Morfometria

Investigações histopatológicas tem se mostrado como uma ferramenta sensível para detectar efeitos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo de organismos aquáticos em experimentos laboratoriais. Agrotóxicos causam mudanças bioquímicas e histopatológicas em peixes e outros organismos aquáticos e essas mudanças são úteis para detectar o efeito de poluentes em vários tecidos e órgãos (Ugurlu, 2015).

Em ambientes aquáticos degradados, principalmente onde ocorrem poluentes em níveis subletais e crônicos, as mudanças estruturais e funcionais nos organismos aquáticos ocorrem mais freqüentemente do que mortalidade em massa, e isto justifica a utilização da análise morfológica de órgãos como um dos métodos para avaliar o efeito de poluentes sobre peixes (Poleksic; Mitrovic-tutundzic, 1993). Os biomarcadores histopatológicos são preciosos como indicadores de saúde geral de peixes, pois refletem os efeitos de exposição a uma variedade de poluentes antropogênicos (van der Oost et al., 2003).

Alterações histológicas em tecidos de peixes constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (Hinton et al, 1992; Schwaiger, et al., 1997). A histopatologia traduz a lesão integrada em função da duração e intensidade da exposição sofrida e a capacidade adaptativa de um determinado tecido (Ferreira, 2004).

A histologia do fígado de peixes difere da de mamífero, uma vez que há uma menor tendência para a disposição dos hepatócitos em cordas ou lóbulos e as típicas tríades portais do fígado de mamíferos não são aparentes. Os hepatócitos são poligonais e tem um núcleo central distinto com cromatina densamente corada e um proeminente nucléolo. Os hepatócitos estão geralmente cheios de glicogênio ou gordura, no entanto, quando a alimentação é ligeiramente inferior a ideal e durante a inanição as células podem estar diminuídas de volume e todo o fígado com pigmentos ceróides amarelados (Roberts, 2012).

A exposição de peixes a agentes químicos ambientais pode induzir lesões em diferentes órgãos e Bernet et al. (1999) cita, dentre os considerados mais importantes como biomarcadores, as brânquias, o fígado e os rins.

O fígado é considerado o principal órgão responsável pelo metabolismo das substâncias químicas, por meio de diferentes reações e processos enzimáticos. No processo de biotransformação, a toxicidade de compostos químicos pode ser alterada pelos mecanismos de detoxificação, originando muitas vezes, metabólitos mais tóxicos que o produto de origem. O fígado é um dos órgãos que tendem a concentrar as substâncias tóxicas em níveis superiores aos da corrente sanguínea. No homem, os efeitos das substâncias hepatotóxicas incluem o aumento de volume do órgão, a necrose, a infiltração linfocítica, a fibrose, a cirrose, além das alterações granulomatosas e o câncer (Pedrozo et al., 2002).

Análises histológicas em órgãos de peixes, especialmente o fígado, mostraram ser uma ferramenta sensível para avaliar tanto processos adaptativos quanto efeitos prejudiciais induzidos por poluentes orgânicos. O fígado de peixes é considerado o mais importante sítio anatômico de armazenamento, biotransformação e excreção de pesticidas (Cengiz E Unlu, 2006). Em nível mundial, estudos intensivos e detalhados de lesões hepáticas representam os exemplos mais convincentes de relação causal entre doenças em peixes e poluição do ambiente aquático (van der Oost et al., 2003). A disfunção hepática é uma resposta comum a agentes químicos e dentre uma variedade de biomarcadores disponíveis encontram-se as alterações histológicas (Timbrell, 1998).

Os métodos de escolha em muitos estudos de histologia hepática são semiquantitativos, uma vez que não são demorados e são mais fáceis para avaliação, mas não são objetivos como os outros. Os métodos morfométricos são mais relevantes do que os semiquantitativos, mas as amostras geralmente não são coletadas sistematicamente, o que pode levar a erro (Rašković, 2011).

4. REFERENCIAS

ADAMS, S. M. (1990) Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J. F; SHUGART, L. R. Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton: Lewis Publishers. p. 30-42.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6bb74e004599e0a48f168fa9166895f7/T48+Tiametoxam+atual.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 12 de abril de 2016.

AGROFIT- Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <<http://agrofit.com.br>>. Acessado em: 12 abril 2016.

ALVES, C.B.M.; VIEIRA, F.; POMPEU, P.S. (2011) Ictiofauna da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. In: BRASIL- Diagnóstico do Macrozoneamento Ecológico-Econômico da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. Brasília, MMA, 488p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, American Water Works Association, Water Environment Federation; *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association: Washington, 1998.

AMORIM JR, A.C. ALBUQUERQUE JR, E. C.; SOUZA, L.S.S. et al. Caracterização físico-química de efluentes contaminados com agrotóxicos oriundos da produção de uva de mesa: para propor um sistema de tratamento In: SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 12., 2014 Natal. Anais... Natal: [s.n.] 2014. p.1-7. (Resumo).

BARROS, M.D.M.; GUIMARÃES-CRUZ, R.J.; VELOSO-JÚNIOR, V.C.; SANTOS, J.E. (2007) Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophisilurus alexandri* steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24:213-221.

BARTON, B.A. (2002) Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integ. and Comp. Biol.*, 42:517-525.

BEDOR C.N.G.; RAMOS, L.O.; RÊGO, M.A.V. et al.(2007) Avaliação e reflexão da comercialização e utilização de agrotóxicos na região do submédio do vale do São Francisco. Rev Baiana Saúde Pública, 31(1):68-76.

BENJAMIM, L.A.(2014) Peixes como bioindicadores de contaminação ambiental. Revista do CFMV, 6: 39-44.

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

BERTOLETTI, E.(1990) Ensaio biológicos com organismos aquáticos e sua aplicação no controle da poluição São Paulo: CETESB

BOSE, S.; NATH, S; SAHANA, S.S.(2011) Toxic impact of tiametoxam on the growth performance and liver protein concentration of a freshwater fish oreochromis niloticus (trewavas).Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. 1(4):274-280.

BRITSKI,H.A.;SATO,Y.;ROSA,A.B.S.(1988).Manual de identificação de peixes da região de três marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Companhia de desenvolvimento do Vale do São Francisco- Codevasf, Brasília. 115p.

CAMPECHE D.F.B.,BALZANA L.,FIGUEIREDO R.C.R.,et al (2011) Peixe nativo do rio São Francisco adaptado para cultivo.Embrapa semiárido. Documento,244.

CARRASCHI,S.P.;BARBUIO,R.; IKEFUTI,C.V. et al.(2014) Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. Aquaculture., 431:124–128.

CARRASCHI,S.P; FLORÊNCIO,T.; GARLICH,N. et.al(2015) Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. Journal of Environmental Chemistry andEcotoxicology.,7(3):31-36.

CENGIZ,E.I.; UNLU,E.(2006) Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissue of mosquitofish,*Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21 :246-253.

CHEN, C. Y.; WOOSTER, G. A.; GETCHELL, R. G. et al. (2003). Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis affected and ozone treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*,218, p.89-102.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.;ESPINDOLA, E.L.G.(2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quím. Nova*,31(7):1820-1830.

DELISO, N.S.; AMARAL-ROGERS,V.; BELZUNCES, L. P.; et al (2015) Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res*, 22, p. 5–34.

EL-SAYED, Y. S.; SAAD, T. T.; EL-BAHR, S. M.(2007) Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. *Environ. Toxicol. Pharm.*,24, p.212-217.

FERREIRA, C.M.(2004) Análises Complementares Obtidas a Partir de Testes de Toxicidade Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO,R.M.; LIZAMA, M. A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela,. p.273-284.

FIRAT,O.; COGUN,H.Y.; YU˘ZEREROG˘LU,T.A.; GOK,G.; FIRAT,O.; KARGIN,F.; KOTEMEN,Y.(2011) A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem.*,37: p.657–666.

FONTAINHAS-FERNANDES A.A.(1998) Tilapia production. In: REIS-HENRIQUES MA(ed) Aquaculture Handbook, pp135-150.

GOMES, M.A.F. & BARIZON, R.R.M.(2014) Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011. Documento, 98. 35p.

GRAZZIERO, D.L.P.(2015) Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. Planta Daninha, 33(1): 83-92.

GRISOLIA, C. K.(2001) Agrotóxicos – mutações, câncer e reprodução. Brasília: editora Universidade de Brasília, 392p.

HAMILTON,M.A.;RUSSO,R.C.;THURSTON,R.V.(1977) Trimed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. Environmental Science Technology, 7(11), p.714 -719.

HELFRICH L. A.,WEIGMANN D. L., HIPKINS P.,STINSON E.R.(1996) Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. Virginia State University, june, p.420-013. Disponível em: www.ext.pt.edu/pubs/waterquality/420-013.html. Acessado em: 02/03/2004.

HINTON,D.E.; BAUMANN,P.C.; GARDNER,G.R.; et al(1992) Histopathology biomarkers. In: HUGGET,R.J.; KIMERLE,R.A.;MEHRLE Jr,P.M.& BERGAMAN,H.L. Biomarkers Biochemical, physiological and histological markers of antropogenic stress. Flórida: Lewis Publishers, p.155-209.

KITAGAWA, A. T.; COSTA, L. S.; PAULINO, R. R.; LUZ, R.K.;ROSA, P. V.; GUERRA-SANTOS, B.;FORTES-SILVA,(2015) R. Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophosilurus alexandri*).Applied Animal Behaviour Science,171, p.211–218.

LOMBARDI, J.V.(2004) Fundamentos de Toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO,R.M.; LIZAMA, M. A.P. Sanidade de Organismos Aquáticos. São Paulo: Varela, p.263-272.

LONDRES, F.(2011) Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA,190p.

LUSKOVÁ, V.; SVOBODÁ, M.; KOLAROVA, J. (2002) The effect of diazinon on blood plasma biochemistry in carp *Cyprinus carpio*. *Acta Vet. Brno.*71: p.117-123.

MACHADO, M.R. (1999)Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas.UNOPAR Científica,1(1) p.63-76.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S.(2008) A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*,12(3), p355-381.

MAIENFISCH,P.;ANGST,M.;BRANDL,F.etal.(2001) Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest. Manag. Sci.*,57(10):906-913.

MARTINEZ C.B.R; CÓLUS, I. M.S.(2002) Biomarcadores em peixes neotropicais para monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MOACYR, E. MEDRI;BIANCHINI, E; SHIBATTA,O.A.;PIMENTA, J.A. A bacia do Rio Tibagi. Londrina: MC Gráfica, p.551-577.

MATTIOLI, C. C. Efeito da salinidade da água sobre juvenis de pacamã *Lophiosilurus alexandri*. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, S. S. O papel da avaliação de riscos no gerenciamento de produtos agrotóxicos: diretrizes para a formulação de políticas públicas. 2005. 236 f. Tese

(Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OMOTAYO, F.; AYO,I.O.; FISAYO, A. A.(2006) HEAMATOLOGICAL AND SERUM BIOCHEMICAL PROFILE OF NILE TILAPIA, *Oreochromis niloticus* FROM ERO DAM IN IKUN EKITI, EKITI STATE NIGERIA. American Journal of Research Communication, 4(4), 2016.

PAMPANIN,D.M.;ANDERSEN,O.K.;VIARENGO,A.;GARRIGUES,P. (2006) Background for the BEEP Stavanger workshops: Biological effects on marine organisms in two common, large, laboratory experiments and in a field study. Aquatic Toxicology, 788: 81-84.

PEDROZO, M.F.M.; BARBOSA, E.M.; CORSEUIL, H.X., et al (2002). Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo. Salvador: CRA.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, p. 339-352

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; MCCARTY, L. S.(1995) Em Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, cap. 1.

RAND,G.M.; PETROCELLI,S.R.(1985) Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application. New york: Hemisphere Publishing Corporation.

RAŠKOVIĆ, B. S.; STANKOVIĆ, M. B.; MARKOVIĆ, Z. Z.; POLEKSIĆ, V. D. (2011) Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. Journal of Agricultural Sciences, 56(1), p. 87-100.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Ed.).(2003) Check list of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA). Porto Alegre: Edipucrs, 729 p.

RIGOTTO, R.M.;VASCONCELOS,D.P.;ROCHA,M.M. (2014) Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. Cad.SaúdePública, 30(7):1-3.

ROBERTS R. J. 2012. Fish Pathology. Wiley-Blackwell, London, 583p.

ROY,B.; NATH,S.(2011) Some haematological investigations on *Oreochromis niloticus* (Trewavas) following exposure Thiamethoxam. Acta Zoologica Lituanica.,21(4):301-305.

SATO,Y.;FENERICH-VERANI,N.;GODINHO,H.P.(2003) Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco, PP 275-289. In: H.P. Godinho e A.L. Godinho(Editores). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte, PUC Minas.

SCHWAIGER J., WANKE R., ADAM S.,et al.(1997). The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of aquatic ecosystem stress and recovery. 6(1):75-86.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; et al.(1997) The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery,6(1):75-86.

SCORZA JÚNIOR, R.P.;RIGITANO, R,L.O.(2012) Sorção, degradação e lixiviação do inseticida tiametoxam em dois solos de Mato Grosso do Sul. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.,16(5):564–572.

SHIBATTA, O.A. (2003) Family Pseudopimelodidae (Bumblebee catfishes, dwarf marbled catfishes); p. 401-405. In R.E. REIS, S.O. KULLANDER AND C.J.

FERRARIS, JR., (ed.) Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs.

SILVA, G.S.; ALBUQUERQUE JR, E.C.; AMORIM JR, A.C. et al. Avaliação da potencial contaminação das águas superficiais e subterrâneas por agrotóxicos em áreas de produção de uva para exportação no vale do São Francisco. In: SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 12., 2014 Natal. *Anais...* Natal: [s.n.] 2014. p.1-7. (Resumo).

TAVARES, D. A. *Análise Morfológica e Imunocitoquímica Do Cérebro De Abelhas Africanizadas Apis Mellifera Após Exposição À Doses Subletais Do Inseticida Tiametoxam*. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

TAVARES-DIAS M., SCHALCH S.H.C., MARTINS M.L., MORAES F.R. (2000) Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em "pesque-pague" do município de Franca, São Paulo, Brasil. *Ars Vet.* 16:76-82.

TIMBREL, J.A. (1998) Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129:1-12.

UĞURLU, P.; ÜNLÜ, E.; SATAR, E.I. (2015) The toxicological effects of thiamethoxam on *Gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937) (Crustacea: Amphipoda). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39:720-726.

van der OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, n.13, p.7-149.

VAN DYK, J.C. *Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation*. 2005. Tese. (University of Johannesburg), Johannesburg.

VICENTE, I.S.T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C.E.(2014) Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. Revista de Ciências Agrárias, 37(4):392-398.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. & PEAKALL, D.B. (1996) Principles of ecotoxicology. London: Taylor & Francis, 1996.

ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E.(2006). Ecotoxicologia aquatic – Princípios e Aplicações. Editora Rima, São Carlos. 464p.

5.ARTIGOS CIENTÍFICOS

O 1º artigo foi encaminhado para o periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** e aprovado para publicação (Comprovante em anexo)

1º Artigo

**TOXICIDADE AGUDA E RISCO ECOTOXICOLÓGICO DO INSETICIDA
TIAMETOXAM PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO**

TOXICIDADE AGUDA E RISCO ECOTOXICOLÓGICO DO INSETICIDA TIAMETOXAM PARA ALEVINOS DE TILÁPIA-DO-NILO

ACUTE TOXICITY AND ECOTOXICOLOGICAL RISK OF THIAMETHOXAM INSECTICIDE TO NILE TILAPIA FINGERLINGS

Ana C.L. Albinati^{1*}, Ricardo C. B. Albinati², Alessandra D. Lira³, Pierre C. Soares⁴

1.Docente CMVET – UNIVASF e Doutoranda Ciência Animal Tropical – UFRPE 2.

Docente EMEV – UFBA;3.Doutoranda UFRGS; 4- Docente DMV –UFRPE

*catarina.albinati@gmail.com

Resumo: O tiametoxam é um inseticida neonicotinóide usado em diversas culturas e classificado como perigoso para o meio ambiente. O objetivo do trabalho foi avaliar a toxicidade aguda do inseticida através da determinação da CL50% e risco ecotoxicológico com mensuração da concentração ambiental estimada (CAE) e do Quociente de Risco (QR). O experimento foi realizado com alevinos de tilápias expostas a 150, 300, 450, 600 e 750mg/L de Actara WG por um período total de 96 horas. O oxigênio dissolvido, pH e temperatura foram mensurados diariamente em todos os aquários. Nos grupos experimentais houve uma variação dos valores de pH e de OD para as diferentes concentrações do inseticida. A CL50% 96hs do Actara® para alevinos de tilápias foi de 322,08 ppm. O quociente de risco (QR) variou de baixo a alto de acordo com a metodologia usada.

Palavras chave: ecotoxicologia, peixe, Actara, CL50.

Abstract: The neonicotinoid insecticide thiamethoxam is used in different cultures and classified as dangerous for environment. The aim of this study was to evaluate the acute toxicity of thiamethoxam by determining the lethal concentration (LC50) and ecotoxicological risk through Estimated Environmental Concentration (EEC) and Risk Quotient (RQ) measurement. The assays were done with Tilapia fingerlings exposed to 150, 300, 450, 600 and 750mg / L Actara WG during 96 hours. Dissolved oxygen, pH and temperature were measured daily in all aquariums. Dissolved oxygen and pH

varied in the experimental groups. The LC50 Actara®; 96 h was 322.08 ppm. The risk quotient (RQ) ranged from low to high according to the methodology used.

Key-words: ecotoxicology, fish, Actara, LC50

Introdução

No modelo agrícola atual, os agrotóxicos são tidos como indispensáveis, sendo também um dos principais poluentes químicos que se difundem pelo planeta (Grisolia, 2005). Na última década o mercado de agrotóxicos no Brasil expandiu rapidamente, num ritmo muito maior do que o apresentado pelo mercado mundial, levando o Brasil a alcançar a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos desde 2008 (Londres, 2011; Rigotto, 2014). A frequência de uso também é maior que a média verificada em países de altas latitudes, em função do clima e dos métodos agrícolas utilizados (Grazziero, 2015). Apesar de úteis na agricultura, a sua ampla utilização tem perturbado o meio ambiente e organismos importantes ao ecossistema (Uğurlu, 2015).

A base dos estudos de Toxicologia Aquática é formada pelo desenvolvimento principalmente de dois testes experimentais, os de toxicidade aguda e de toxicidade crônica. Os testes de toxicidade aguda proporcionam rápidas respostas na estimativa dos efeitos letais de um agente tóxico sobre organismos aquáticos. Compreendem análises experimentais de curta duração (24-96 horas), que visam determinar a concentração letal média (CL50%). Os testes de toxicidade aguda geram dados que servem de base para a elaboração de outros estudos subsequentes, como os testes de toxicidade crônica e avaliações de risco ecotoxicológico (Lombardi, 2004).

O tiametoxam é um inseticida neonicotinóide de segunda geração que apresenta classificação toxicológica III (medianamente tóxico) e classe ambiental III (perigoso para o meio ambiente). O mecanismo de ação do Tiametoxam é por ligação nos receptores nicotínicos da acetilcolina (Maiennfisch, 2001). Essa nova geração de inseticidas veio substituir os organofosforados e carbamatos, os quais tem diminuído a sua eficiência devido a resistência dos insetos, ou ainda, sendo menos utilizados considerando o aumento das restrições de seu uso, levando em consideração os aspectos toxicológicos no campo (Tavares, 2011). Pouco se sabe sobre sua toxicidade para os organismos de água doce não-alvo e seu potencial efeito nos ecossistemas de água doce (Uğurlu, 2015).

Os produtos a base de tiametoxam são utilizados em diversas culturas como: abacaxi, abobrinha, alface, arroz, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar, citros, feijão-vagem, fumo, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pepino, pêssego, pimentão, repolho, tomate e uva (Agrofit, 2012). Além do uso agrícola, o tiametoxam tem sido prospectado para o uso em aquicultura, de acordo com Carraschi *et al.* (2014), o produto apresenta alta eficácia no controle de *Anacanthorus penilabiatus* em Pacus.

De acordo com levantamento realizado por Scorza Jr e Rigatano (2012) a existência de alguns estudos sobre a degradação, sorção e lixiviação do tiametoxam nas condições edafoclimáticas brasileiras, demonstram a alta persistência e intensa lixiviação nos solos. Em estudo realizado por Silva *et al.* (2014) foi demonstrado que o tiametoxam é moderadamente persistente no solo e tem alto potencial de transporte quando dissolvido em água.

Alguns autores consideram o Tiametoxam praticamente não tóxico para peixes (Maeinfisch, 2001), no entanto, ainda são poucos os estudos realizados sobre os efeitos do tiametoxam com esses animais. Carraschi (2014) estudando os riscos ambientais e ecotoxicologia do tiametoxam sobre Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), relata que o produto é ligeiramente tóxico para a espécie estudada, que existe um risco de intoxicação ambiental e que a presença do tiametoxam diminui o oxigênio dissolvido na água.

Bose *et al.* (2011) observaram que em tilápias do Nilo expostas a doses subletais de tiametoxam ocorreu um impacto significativo no crescimento dos animais e distúrbios hematológicos foram observados por Roy e Nath, (2011). Neste contexto torna-se importante o estudo dos efeitos do tiametoxam em peixes e para isso optou-se pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), espécie exótica mais cultivada no Brasil. Desta forma o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade aguda do tiametoxam através da determinação da concentração letal 50% (CL50) para tilápias do Nilo e o risco ecotoxicológico de seu uso.

Material e métodos

O experimento conduzido foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, sob o número 36/2014.

O experimento foi realizado com 240 alevinos de Tilápias (*Oreochromis niloticus*), adquiridos de uma piscicultura comercial, com peso médio de $0,55 \pm 0,13$ g e clinicamente hígidos. Os animais ao chegarem foram colocados em tanques de fibra de vidro de 500L, com aeração artificial, onde foram mantidos para aclimação por 10 dias. Os animais foram alimentados com ração comercial própria para a espécie, três vezes ao dia, durante a aclimação, sendo a alimentação suspensa 24 horas antes do início do experimento, de acordo com as recomendações das normas de ensaio de toxicidade aguda com peixes da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (ABNT, 2011).

O inseticida utilizado foi o Actara 250WG®, produto comercial à base de Tiametoxam, comercializado pela Syngenta Proteção de Cultivos LTDA. Na sua composição estão presentes 250g/kg de 3-(2-Cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5] oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina e 750 g/kg de ingredientes inertes.

Os parâmetros de qualidade da água como oxigênio dissolvido, pH e temperatura foram mensurados diariamente em todos os aquários. O oxigênio dissolvido foi medido com medidor de oxigênio dissolvido (Instrutherm MO-880); o pH por meio de medidor de pH digital portátil (Instrutherm pH-1700); a temperatura com termômetro de digital (TE-300).

O experimento foi realizado num período total de 96 horas, com observação e quantificação de mortalidade a cada 24 horas. Para tanto, foram utilizadas 24 caixas plásticas com 20 litros de água dechlorada, em sistema estático com aeração artificial. Foram utilizadas cinco diferentes concentrações do inseticida e um controle (sem inseticida), com 4 repetições por tratamento. As concentrações utilizadas foram 150, 300, 450, 600 e 750mg/L de Actara WG.

Foram utilizados dez peixes por caixa, perfazendo um total de 40 peixes por tratamento. A partir da mortalidade diária foi calculada a CL50%. Os riscos ecotoxicológicos foram avaliados a partir do cálculo da concentração ambiental estimada (CAE) e do Quociente de Risco (QR). Para o cálculo da CAE, foram considerados os cenários de um reservatório de 1 hectare de área com 0,3 m de profundidade e com 2,0 m de profundidade, embasado em trabalho descrito por Manrique *et al.* (2013).

Os cálculos foram realizados para uma diluição de 100% da maior dose recomendada na bula do Actara, que é de 2000 g i.a./ ha. A CAE refere-se a razão entre 100% da maior dose recomendada e o volume total do reservatório. Para o cálculo do Quociente de Risco (QR) que é revelado a partir da razão entre CAE e CL50%, foram utilizadas as CAE's calculadas conforme mencionadas anteriormente, assim como uma CAE de 75mg/L, que representa a concentração mais eficaz no controle de parasitas em Pacus (Carraschi *et al.*, 2014).

As CL50% utilizadas foram baseadas no produto formulado, assim como na porcentagem de ingrediente ativo presente no produto (25%). A classificação de risco foi baseado nos índices da USEPA (1996).

Para a determinação da CL50% os dados de mortalidade observados foram avaliados com o programa estatístico TrimmedSpermanKarber (Hamilton *et al.*, 1977). Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS 2002), utilizando-se o procedimento GLM. Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (P) de 5%. Nos casos em que houve significância no teste F as médias de pH e de oxigênio dissolvido na água (OD) foram submetidas à análises de regressão, por se tratar de dados contínuos. Realizou-se, também, análise de regressão para a mortalidade de alevinos em função da concentração do inseticida.

Resultados e Discussão

A qualidade da água manteve-se dentro da normalidade durante o experimento nos grupos controle, com um pH médio em torno de $8,1 \pm 0,1$; oxigênio dissolvido (OD) de $7,1 \pm 0,4$ mg/l e uma temperatura de $27,4 \pm 0,3$ °C. A temperatura, OD e pH da água numa situação de conforto para peixes tropicais deve estar entre 28-32°C, superior a 5mg/Le entre 6,5-8,0, respectivamente (Kubtiza e Kubtiza, 2000; Brasil, 2005). Nos grupos experimentais houve uma variação dos valores de pH (Fig.1) e de OD (Fig.2) para as diferentes concentrações do inseticida, com valores de pH variando de 5,2 a 8,2 e de OD de 3,7 a 7,5mg/L, embora sem correlação linear significativa entre essas variáveis e sem que atingissem valores letais de pH ou de OD para os peixes.

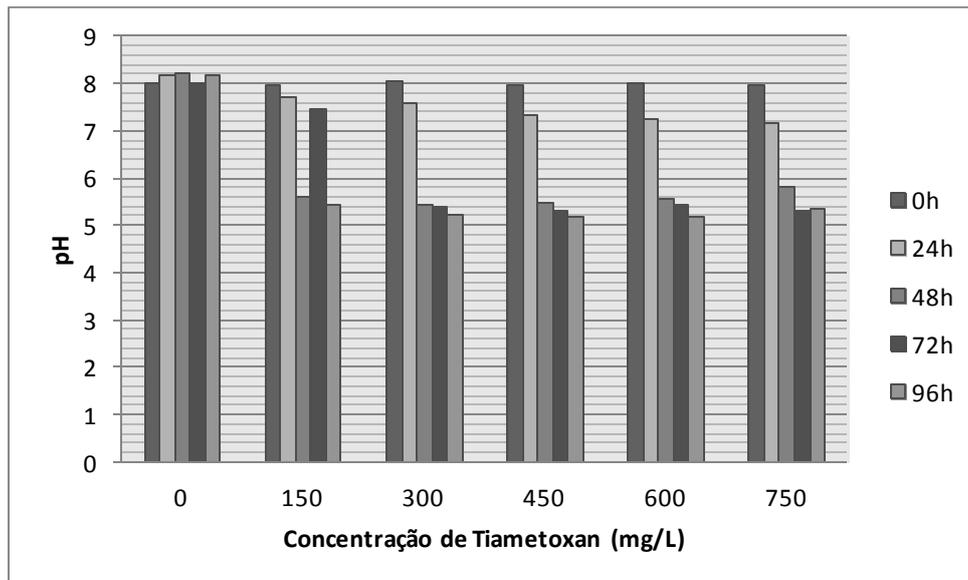


Figura 1. Variação do pH da água em função do tempo de exposição ao inseticida, para diferentes concentrações de Tiametoxam

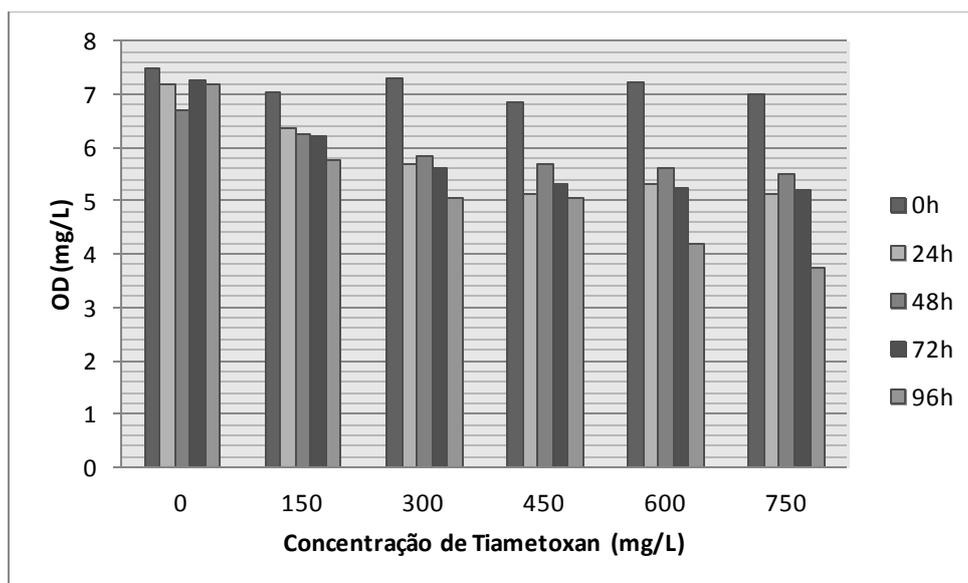


Figura 2. Variação do Oxigênio Dissolvido (OD) na água em função do tempo de exposição ao inseticida, para diferentes concentrações de Tiametoxam

Nas figuras 1 e 2 observa-se que, embora tenha havido uma redução dos valores de pH e OD da água, em função do tempo de exposição ao inseticida, nas diferentes concentrações de Tiametoxam, não houve uma correlação linear entre essas variáveis. O valor mais baixo de OD foi de 3,7mg/L após 96 horas de exposição a 750mg/L do inseticida, este foi o único valor abaixo do recomendado, porém acredita-se que essa

baixa concentração de OD não tenha sido a causa da mortalidade ocorrida nesse tanque, tendo em vista a rusticidade da espécie em estudo (Kubitza, 2000).

Carraschi (2014) também encontrou uma baixa de OD em testes de toxicidade aguda nos peixes Mato Grosso e Pacu e no caramujo *Pomacea*, sendo observados valores de OD que variaram de 5,6mg/L no controle a 0,60mg/L após 48 horas de exposição a 60mg/L de Tiametoxam em peixes da espécie Mato Grosso, e em Pacus o OD variou de 3,11mg/L no controle a 0,40mg/L após 24 horas de exposição a 35mg/L do inseticida. A autora atribui essa diminuição a ação do inseticida e também ao consumo do oxigênio pelos organismos testes.

Em relação a mortalidade, no entanto, ao final das 96 horas de exposição, pode-se observar uma ocorrência de 2,5% no grupo controle, 10% no exposto a 150mg/L, 32% em 300mg/L, 87,5% em 450mg/L, 95% em 600mg/L e 100% em 750mg/L (Fig.3), indicando um crescimento linear da mortalidade na medida em que se aumentou a concentração do inseticida ($Y=22,8X - 25,3$, com $R^2 = 0,91$). Carraschi (2014) também encontrou um aumento linear da mortalidade tanto para o Mato Grosso quanto para o Pacu.

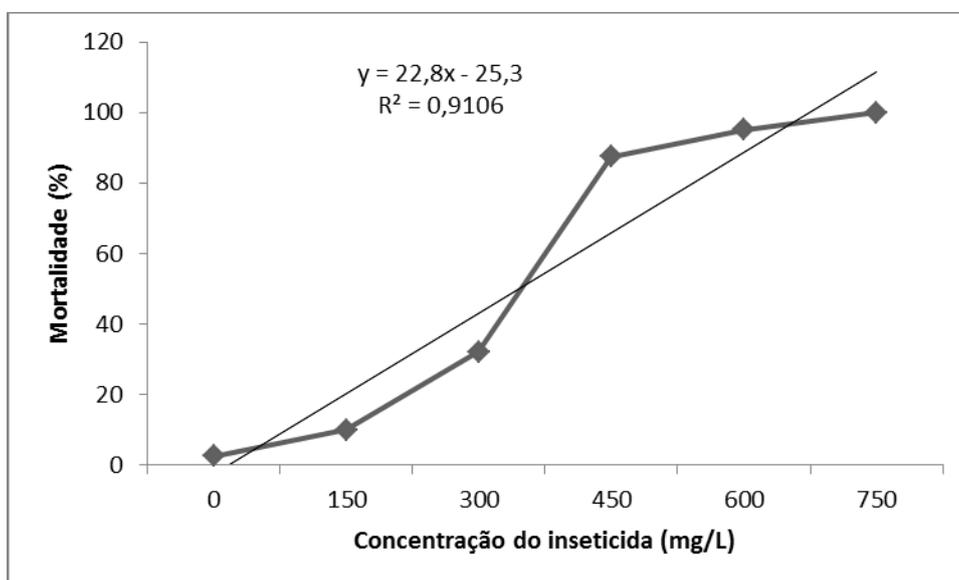


Figura 3. Mortalidade de alevinos de Tilápia do Nilo expostos a diferentes concentrações de Tiametoxam por 96 horas.

Assim, apesar do inseticida ter afetado a qualidade da água, parece não ser esta a razão da mortalidade dos peixes, que parece ser mais atribuída à ação deletéria do inseticida.

Os valores de CL50%, calculados em ppm do produto comercial total, em 24, 48, 72 e 96 horas e seus limites de confiança foram respectivamente: 430,25 (378,65 – 488,88); 415,39 (361,88 – 476,81); 410,60 (358,04 – 470,87) e 322,08 (288,79 – 359,21). A CL50% 96hs do Actara® para alevinos de tilápia foi de 322,08ppm, sendo considerado praticamente não tóxico (>100mg/L) de acordo com Zucker (1985).

A CL50% apresentada foi calculada baseada no produto comercial que tem apenas 25% do ingrediente ativo, portanto se extrapolados os valores de CL50% achados somente para a porcentagem referente ao ingrediente ativo, obter-se-á uma CL50% de 80,52mg/L, que sai da faixa de praticamente não tóxico para pouco tóxico (10 < CL 50 < 100 mg/L) (Zucker, 1985).

Se comparados com os valores encontrados por Carraschi *et al.* (2015) para Pacu e Mato Grosso, respectivamente de 16,97mg/L e 49,78mg/L, observa-se que a toxicidade para as três espécies encontram-se na mesma faixa de pouco tóxico. Barbee e Stout (2009) encontraram CL50% maior que 100mg/L para Truta Arco-íris e maior que 114mg/L para Bluegillsunfish. De acordo com Anderson *et al.* (2015), poucas espécies de peixes tem sido estudadas quanto a sensibilidade a neonicotinóides.

Os poucos trabalhos de toxicidade aguda com o cálculo de CL50% encontrados demonstram a baixa toxicidade do produto. No entanto, alguns trabalhos relatam alterações não letais, mas que comprometem a homeostase dos animais (Bose *et al.*, 2011; Roy e Nath, 2011; Georgieva *et al.*, 2014). Apesar da baixa toxicidade do tiametoxam, no que diz respeito a CL50%, o mesmo deve ser melhor avaliado quanto a efeitos subletais e crônicos, uma vez que esse produto comercial tem sido prospectado para o uso como agente terapêutico para peixes.

Outro aspecto avaliado é o risco ambiental do inseticida e segundo Spadotto (2009) a avaliação de risco ambiental deve ser feita para o defensivo como produto formulado, considerando-se os dados do produto técnico com suas impurezas e dos produtos de degradação relevantes.

Assim, em relação aos riscos ecotoxicológicos, realizado por meio da avaliação de concentração ambiental estimada (CAE) e do Quociente de Risco (QR), pode-se

observar a partir dos dados da Tabela 1 que houve uma variação entre os resultados de QR, a depender do método utilizado para o cálculo. No cenário de 2m de profundidade, quando se utiliza a CL50% , baseada no produto comercial, tem-se uma QR de 3,10 considerada alta. Para uma profundidade de 0,3m, no entanto, o risco é baixo para o produto comercial com uma QR de 0,002.

No entanto, se os cálculos forem feitos considerando o valor estimado do princípio ativo do inseticida, a QR para o tiametoxam será baixa, independentemente da profundidade utilizada nos cálculos. Quando considerada a CAE de 75mg/L, baseada na dose eficaz para controle de parasitas em Pacus, relatada por Carraschi et al. (2014), o risco é considerado médio para o produto comercial e alto para o ingrediente ativo o que esta de acordo com o encontrado pela mesma autora que relatou alto risco ambiental do tiametoxam em todas as espécies estudadas: a planta aquática *Lemna minor*, o caramujo *Pomacea canaliculata*, o microcrustáceo *Daphnia magna*, e os peixes *Hyphessobrycon eques* e *Piaractus mesopotamicus* (Carraschi et al., 2015).

Tabela 1. Concentração Ambiental estimada e Quociente de Risco para Tilápia do Nilo

Profundidade					
Dose	(m)	CI50	CAE	QR	Risco
2000g ia/ha	0,3	322mg/L(Actara)	0,66	0,002	Baixo
2000g ia/ha	0,3	80,5 mg/L (% ia)	0,66	0,0081	Baixo
2000g ia/ha	2,0	322mg/L(Actara)	0,1	3,10	Alto
2000g ia/ha	2,0	80,5 mg/L (% ia)	0,1	0,0012	Baixo
75mg/L	-	322mg/L(Actara)	75	0,23	Médio
75mg/L	-	80,5 mg/L (% ia)	75	0,93	Alto

Segundo Rebelo e Caldas (2014), quando o QR alcança valores altos, pode existir uma situação de risco potencial para organismos não-alvos, podendo requerer uma ação regulatória. Os mesmos autores relatam ser o QR um método eficiente e barato de identificar situações de risco, permitindo decisões de gestão.

Conclusões

A CL50% 96 horas do Actara 250WG®, para alevinos de tilápias do Nilo foi de 322,08ppm, considerada praticamente não tóxica. Nesse período, a presença do produto na água ocasiona a diminuição do pH e do oxigênio dissolvido. O quociente de risco (QR) varia de baixo a alto de acordo com a metodologia usada.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida à primeira autora (IBPG -0903-5.05/11).

Referências

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro: ABNT, 2011.
- AGROFIT- Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <<http://agrofit.com.br>>. Acessado em: 18 jul. 2012.
- ANDERSON, J.C.; DUBETZ, C.; PALACE, V.P. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment.*, n.505, p. 409–422, 2015.
- BARBEE, G.C.; STOUT, M.J. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with ricecrayfish crop rotations. *Pest Manag Sci.*, n.65, p.1250-1256, 2009.
- BOSE, S.; NATH, S; SAHANA, S.S. Toxic impact of tiametoxam on the growth performance and liver protein concentration of a freshwater fish *Oreochromis niloticus* (trewavas). *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences.*, v.1, n.4, p.274-280, 2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília: DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2005.
- CARRASCHI, S.P. *Ecotoxicidade, segurança clínica e eficácia de fármacos em jovens de Pacu (Piaractus mesopotamicus)*. 2014. 101f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

- CARRASCHI, S.P.; BARBUIO, R.; IKEFUTI, C.V. et al. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*.,n.431, p.124–128,2014.
- CARRASCHI, S.P; FLORÊNCIO, T.; GARLICH, N. et al. Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*., v.7,n.3, p.31-36,2015.
- GEORGIEVA, E.; STOYANOVA, S.; VELCHEVA, I. et al. Histopathological alterations in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Gills Caused by Thiamethoxam. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.57 n.6, p.991-996, 2014.
- GRAZZIERO, D.L.P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. *Planta Daninha*., v. 33, n. 1, p. 83-92, 2015.
- GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos – mutações, câncer e reprodução. Brasília: editora Universidade de Brasília, 2005. 392p.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. TrimedSperman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. *Environmental Science and Technology*., v. 7, p. 714-719, 1977.
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: Fernando Kubitza, 2000. 285p.
- KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M.M. Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. *Panorama da Aquicultura*.,v.10, n.59, p.44-53, 2000.
- LOMBARDI, J.V. Fundamentos de Toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. Sanidade de Organismos Aquáticos. São Paulo: Varela, 2004. p.263-272.
- LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2011.190p.
- MAIENFISCH, P.; ANGST, M.; BRANDL, F. et al. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest. Manag. Sci.*, v.57, n.10, p.906-913, 2001.
- MANRIQUE, W.G.; FIQUEIREGO, M.A.P.; MACHADO-NETO, J.G. Dissipation and environmental risk of fipronil on aquatic environment. *The Biologist (Lima)*.,v. 11, n. 1, p. 107-117, 2013.

- REBELO, R.M.; CALDAS, E.D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Quim. Nova.*, v. 37, n.7, p.1199-1208, 2014.
- RIGOTTO, R.M.; VASCONCELOS, D.P.; ROCHA, M.M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Cad. Saúde Pública.*, n. 30, v.7, p.1-3,2014.
- ROY, B.; NATH, S. Some haematological investigations on *Oreochromis niloticus* (Trewavas) following exposure Thiamethoxam. *Acta Zoologica Lituanica.*, v.21, n. 4, p.301-305, 2011.
- STATISTICAL analysis system, versão 8.2. 6th ed. Cary, NC: SAS, 2002.
- SCORZA JÚNIOR, R.; RIGATANO, R.L.O. Sorção, degradação e lixiviação do inseticida tiametoxam em dois solos de Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.*,v.16, n.5, p.564–572, 2012.
- SILVA, G. S.; ALBUQUERQUE JR, E. C.; AMORIM JR, A.C. et al. Avaliação da potencial contaminação das águas superficiais e subterrâneas por agrotóxicos em áreas de produção de uva para exportação no vale do São Francisco. In: SIMPÓSIO ÍTALO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL,12.,2014 Natal. *Anais...* Natal: [s.n.] 2014. p.1-7. (Resumo).
- SPADOTTO, C.A. Avaliação de riscos ambientais do uso de defensivos agrícolas para a qualidade da água. *Horticultura Brasileira*, v. 27, n.2, p. 4060-4070, 2009.
- TAVARES, D. A. Análise Morfológica e Imunocitoquímica Do Cérebro De Abelhas Africanizadas *Apis Mellifera* Após Exposição À Doses Subletais Do Inseticida Tiametoxam. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- UĞURLU, P.; ÜNLÜ, E.; SATAR, E.I. The toxicological effects of thiamethoxam on *Gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937)(Crustacea: Amphipoda). *Environmental Toxicology and Pharmacology.*, v.39, p.720-726,2015.
- USEPA - US Environmental Protection Agency. Proposed Guidelines for Ecological Risk Assessment. Washington, DC:USEPA, 1996.
- ZUCKER, E. Standard Evaluation Procedure: Acute toxicity test for freshwater fish. Washington, DC: USEPA, 1985.

2º Artigo

O 3º artigo foi redigido de acordo com as normas do periódico **Artigo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** para o qual será submetido (normas em anexo).

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, HISTOPATOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EXPOSTOS À CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DO INSETICIDA TIAMETOXAM

Parâmetros bioquímicos, histopatológicos e morfométricos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) expostos à concentração subletal do inseticida tiametoxam

Biochemical, histopathological and morphometric parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of the insecticide thiamethoxam

Ana C.L. Albinati^{1*}, Eduardo L. T. Moreira², Ricardo C. B. Albinati², Valdemiro A. da Silva Júnior³, Cristiane Scavuzzi Moura⁴, Jaciane V. Carvalho⁵, Pierre C. Soares³

1.Docente CMVET – UNIVASF e Doutoranda Ciência Animal Tropical – UFRPE; 2. Docente EMEV – UFBA; 3. Docente DMV –UFRPE; 4-PNPD/CAPES – UFRPE; 5-Médica veterinária autônoma.

*catarina.albinati@gmail.com

Resumo: O tiametoxam é um inseticida da classe de neonicotinóides que apesar de estar no mercado há mais de 20 anos ainda são poucos os estudos acerca de sua toxicidade para peixes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade de um inseticida a base de tiametoxam para a tilápia do Nilo, avaliando parâmetros histológicos e morfométricos do fígado e bioquímica sérica de animais expostos a concentração subletal de tiametoxam. Foram utilizados juvenis de tilápia expostos a 32 mg/L de ActaraWG[®] em sistema estático, por 24, 48, 168 e 360 horas. Na avaliação histológica constatou-se necrose em hepatopâncreas em maior grau de severidade nos animais expostos ao inseticida em relação ao controle, o que foi confirmado por meio da análise morfométrica, onde foi observada a presença de uma maior quantidade de pontos de interseção sobre hepatócitos mortos nos animais do grupo exposto. Na análise bioquímica foi observada uma diminuição na proteína total com elevação de triglicerídeos do grupo exposto em relação ao controle. Concluiu-se que o tiametoxam em concentração subletal provoca necrose em hepatopâncreas e interfere em alguns parâmetros bioquímicos de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: agrotóxico, peixe, histopatologia, morfometria, bioquímica

Abstract: Thiamethoxam is a neonicotinoid insecticide that despite being on the market for more than 20 years there are few studies about its toxicity to fish. The aim of this research was to evaluate the toxicity of thiamethoxam for Nile tilapia, through histologic and morphometric parameters of liver and serum biochemistry of animals exposed to sublethal concentration of thiamethoxam. Were used tilapia juveniles exposed to 32mg/L ActaraWG® in a static sytem for 24, 48,168 and 360 hours. Histological evaluation found hepatopancreas necrosis in greater severity in animals exposed to insecticide which was confirmed by morphometric analysis, where was observed the presence of a higher amount of intersection points in dead hepatocytes from exposed group. In biochemical analysis it was observed a decrease in total protein with increase triglycerides in exposed group compared to control. It was concluded that thiamethoxam in sublethal concentration causes necrosis in hepatopancreas and interfere in some biochemical parameters of Nile tilapia.

Keywords: pesticides, fish, histopathology, morphometry, biochemical

Introdução

Os neonicotinóides são uma nova classe de inseticidas desenvolvidos nas últimas três décadas, que agem como agonistas nos receptores nicotínicos de acetilcolina dos insetos (Singh 2012).

O tiametoxam representa o primeiro neonicotinóide de segunda geração disponível comercialmente, desde 1998, representados pelo Actara para uso foliar e no solo e pelo Cruiser para tratamento de sementes (Maenfisch, 2001). Atualmente, no Brasil existem oito produtos comerciais à base de tiametoxam registrados (Agrofit, 2016). Apesar de ter sido lançado há quase 20 anos, poucos são os trabalhos acerca de sua toxicidade para peixes.

A tilápia do Nilo é um dos peixes mais cultivados no mundo e apresenta características como rápido crescimento, adaptabilidade a dietas variadas, alta resistência a doenças, práticas de manejo, fácil reprodução em cativeiro, e adequada resistência a uma ampla variedade de condições ambientais, que validam seu uso como modelo para estudos toxicológicos (Fontainhas-Fernandes, 1998).

Agrotóxicos causam mudanças bioquímicas e histopatológicas em peixes e outros organismos aquáticos e essas mudanças são úteis para detectar o efeito de poluentes em vários tecidos e órgãos (Ugurlu, 2015).

Alterações em parâmetros séricos podem ser resultado de dano a um tecido alvo, podendo os mesmos serem utilizados como indicadores rápidos e sensíveis de monitorização em relação a impacto das substâncias tóxicas nos organismos aquáticos e em todo o ecossistema (Firat, 2011).

Objetivou-se avaliar a toxicidade de um inseticida à base de tiametoxam para tilápias do Nilo expostas à concentrações subletais por 24, 96, 168 e 360 horas por meio de biomarcadores do perfil energético e protéico séricos e de análise histopatológica.

Material e métodos

O experimento conduzido foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob o número 36/2014.

O experimento consistiu na exposição dos peixes a 10% da CL50 para a espécie que é de 322,08 mg/L do Actara[®] (Albinati et al., 2014), portanto a exposição foi a uma concentração de 32 mg/L do Actara[®].

O experimento foi realizado com 96 juvenis de tilápias (*Oreochromis niloticus*), adquiridos de uma piscicultura comercial, com peso médio de 41,6g +- 8,2 e clinicamente hígidos. Os animais foram colocados em tanques de fibra de vidro de 1000L, com aeração artificial, onde foram mantidos para aclimatação por cinco dias. Após o período de aclimatação, os peixes foram distribuídos em tanques de 200 L, com aeração artificial onde foi realizado o experimento. Nesses tanques passaram por cinco dias de adaptação antes do início do experimento. Os animais foram alimentados durante todo o experimento com ração comercial MP-31 da Primor agropecuária do Nordeste LTDA, com níveis de garantia de cálcio 2,5%; extrato etéreo 5%; fósforo 0,8%; matéria fibrosa 7%; matéria mineral 10%; proteína bruta 30% e umidade 13%.

O inseticida utilizado foi o Actara 250WG[®], produto comercial à base de tiametoxam, comercializado pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. Na sua composição estão presentes 250g/kg de 3-(2-cloro-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina) e 750 g/kg de ingredientes inertes.

Os parâmetros de qualidade da água como oxigênio dissolvido, pH e temperatura foram mensurados diariamente em todos os tanques. O oxigênio dissolvido foi medido com oxímetro digital, o pH por meio de medidor de pH digital portátil; a temperatura com termômetro de digital.

Para realização do experimento os animais foram mantidos em 8 tanques com 200 L de água de clorada com aeração artificial, sendo colocados 12 animais por tanque, com 4 tanques para o grupo controle (G1), sem a presença do inseticida e 4 tanques com 32 mg/L do Actara® (G2). Foi feita a coleta de 3 peixes por caixa, a cada amostragem, totalizando 12 peixes do grupo controle e 12 peixes do grupo exposto por período amostral. O experimento foi realizado durante o período de 15 dias (360 horas) com coleta de material após 24, 96, 168 e 360 horas de exposição, totalizando 4 coletas temporais.

Em cada amostragem os animais foram capturados individualmente e feita a coleta de sangue, logo em seguida os animais foram anestesiados para o procedimento de eutanásia e coleta do fígado para análise histopatológica.

De cada peixe foi colhida cerca de 1 mL de sangue por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas sem anticoagulante para obtenção de soro. As amostras foram individualmente centrifugadas por 15 minutos a 5000 rpm obtendo-se cerca de 0,5 mL de soro. O soro foi aliqotado em tubos cones de plástico, tipo Eppendorf, e armazenados em freezer para análises bioquímicas (creatinina, ureia, glicose, proteína total, albumina, colesterol, triglicérides, aspartatoaminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase). As amostras foram determinadas em analisador bioquímico semi automatizado.

Após a coleta do sangue, os animais foram individualmente anestesiados por imersão em solução anestésica (benzocaína 100mg/L) e após atingirem plano anestésico, foram eutanasiados por secção medular.

Imediatamente após a eutanásia foram coletados fragmentos de fígado para análise por microscopia óptica. Os fragmentos foram fixados em solução fixadora ALFAC, composta de álcool, formol e ácido acético por 12 horas e transferidos para uma solução de álcool a 70%, sendo processados segundo a técnica rotineira de inclusão em parafina (Prophet, 1992). A coloração utilizada foi hematoxilina e eosina (HE).

Alguns cortes foram submetidos a técnica histoquímica do ácido periódico de Schiff (PAS) para confirmar a presença de glicogênio.

Para a análise histológica foram utilizados 6 animais de cada grupo e seções de 5μ de espessura foram analisadas em microscópio de luz branca. As alterações encontradas foram classificadas individualmente de acordo com o grau da lesão no tecido. Foi utilizado um sistema de graduação semiquantitativa, que variou de um a três, sendo 1- mínimo, 2-moderado, 3-severo, além do zero quando a alteração não era vista no tecido. Os dados foram avaliados por meio de dispersão de frequência absoluta.

A análise morfológica consistiu da avaliação do número de pontos de interseção sobre hepatócitos mortos e para tanto foi utilizado o sistema de contagem de pontos por alocação sistemática de interseção, onde de cada animal foram feitas 5 imagens em aumento de 400x de campos distintos. Em cada imagem foi sobreposta uma gradícula com 441 pontos de interseção, totalizando a análise de 2205 pontos por animal.

Os parâmetros bioquímicos e o número de pontos de interseção sobre hepatócitos mortos foram testados, inicialmente, quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados que não atenderem a estas premissas foram submetidos à transformação com base logarítmica (Log10) (creatinina, AST, FA e LDH) ou pela raiz quadrada [RQ (x+1)] (ureia).

Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2009), utilizando-se o procedimento GLM do SAS. Nos casos em que houve significância no teste F as médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

As análises foram efetivadas conforme modelo estatístico: $Y_{ij} = \mu + G_i + H_j + G_iH_j + \epsilon_{ij}$, onde: Y_{ij} = observação referente ao tratamento i na j repetição; μ = constante associada a todas as observações; G_i = efeito do grupo i na repetição j ; H_j = efeito das horas de coleta na j repetição; G_iH_j = efeito da interação; ϵ_{ij} = erro associado a todas as observações. Também foi realizada análise de regressão, em função das horas, para a contagem de hepatócitos mortos. Quanto à distribuição das alterações hepáticas de acordo com o grupo, o tempo e a graduação, os dados foram apresentados com base na dispersão de frequência. Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (p) de 5%.

Resultados

A qualidade da água não variou entre o grupo controle e experimental, permanecendo ambos com um oxigênio dissolvido médio de $6,0 \pm 0,8$ mg/L, um pH de $6,9 \pm 0,3$ e uma temperatura de $26,3 \pm 0,6$. Não houve nenhum óbito durante o período experimental.

Na análise bioquímica considerando o fator de variação “Grupos”, verificou-se que as variáveis proteína total (PT) ($p=0,0368$) (Tab 1) e triglicerídeos ($p=0,0237$) (Tab 2) variaram entre grupos, ou seja, maior concentração sérica de PT observada nos peixes do G1, enquanto que maiores concentrações de triglicerídeos séricos foram observadas nos peixes do G2.

Quanto ao fator de variação “Horas”, variações significativas foram observadas na concentração sérica de ureia ($p<.0001$), creatinina ($p<.0001$), colesterol ($p=0,0032$), triglicerídeos ($p=0,0002$), além da atividade enzimática da FA ($p=0,0008$) e LDH ($p=0,0152$) (Tab 1 e 1).

Maiores concentrações séricas de ureia e atividade enzimática de LDH foram observadas 360 horas em relação às demais horas das coletas. Quanto aos biomarcadores, creatinina, colesterol e atividade enzimática da FA, maiores concentrações foram observadas 24 horas em relação às demais horas das coletas. A concentração sérica de triglicerídeo foi maior em 96 horas, diferindo das demais horas da coleta de material biológico dos peixes.

Foi registrada interação significativa entre Grupos e Horas para a variável glicose ($p=0,0031$). Neste caso, considerando diferenças entre grupos dentro de cada hora, verifica-se que maiores concentrações plasmáticas de glicose foi observada nos peixes do G1, diferindo do G2 no tempo 360 horas. Já em relação às diferenças entre Horas, dentro de cada grupo, foi possível identificar que maior concentração de glicose ocorreu 360 horas nos peixes do G1, diferindo das demais horas de coleta. Quanto ao G2, não houve variação entre as horas de coleta. A interação entre grupos e horas de coletas ocorreu 360 horas das coletas de material biológico dos peixes intoxicados ou não com inseticida Tiametoxam (Tab 2; Fig 1).

Tabela 1. Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (*p*) dos fatores de variação de parâmetros bioquímicos do sangue do perfil proteico de Tilápia do Nilo expostos ou não por inseticida Tiametoxam.

Parâmetros	Grupos	Horas				Média Geral	Fatores de variação		
		24	96	168	360		Grupos	Horas	G x H
Perfil protéico									
Proteína Total (g/L)	G1	30,43±7,02	28,06±4,02	26,72±3,17	30,23±9,54	28,69A	0,0368	0,3481	0,2813
	G2	28,82±5,27	26,26±6,85	25,97±7,02	22,63±4,74	25,93B			
Média Geral		29,44 ^a	27,08 ^a	26,31 ^a	26,05 ^a				
Albumina (g/L)	G1	10,78±3,51	8,85±2,06	8,45±1,38	10,09±3,76	9,49A	0,3522	0,5078	0,6260
	G2	9,02±2,76	9,45±2,72	8,29±2,51	8,73±5,85	8,87A			
Média Geral		9,86 ^a	9,15 ^a	8,37 ^a	9,31 ^a				
Globulina (g/L)	G1	20,66±5,94	19,69±3,39	18,27±2,92	20,14±8,46	19,60A	0,0720	0,5271	0,6166
	G2	19,80±5,72	16,81±6,60	17,68±5,06	15,43±4,62	17,42A			
Média Geral		20,14 ^a	18,13 ^a	17,95 ^a	17,55 ^a				
Ureia (mmol/L)	G1	1,14±0,39	0,77±0,13	0,65±0,21	1,01±0,62	0,89A	0,3219	<,0001	0,9953
	G2	1,10±0,23	0,70±0,13	0,56±0,08	0,91±0,43	0,82A			
Média Geral		1,12 ^a	0,74 ^b	0,60 ^b	0,96 ^a				
Creatinina (µmol/L)	G1	49,33±12,81	27,10±8,82	25,12±9,02	38,92±8,41	35,12A	0,9126	<,0001	0,0801
	G2	42,94±12,03	28,20±7,62	33,66±11,53	33,05±13,29	34,46A			
Média Geral		45,84 ^a	27,70 ^b	29,78 ^b	35,71 ^b				

Letras minúsculas distintas na mesma linha e letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (p) dos fatores de variação de parâmetros bioquímicos do sangue do perfil energético e atividade enzimática de Tilápia do Nilo r xpostos ou não por inseticida Tiametoxam.

Parâmetros	Grupos	Horas				Média	Fatores de variação		
		24	96	168	360	Geral	Grupos	Horas	G x H
Perfil energético									
Glicose (mmol/L)	G1	4,22±1,19 bA	4,49±0,91 bA	4,52±0,82bA	6,59±1,80 aA	4,91	0,2282	0,0002	0,0031
	G2	5,08±1,05aA	4,08±0,88aA	4,59±1,20aA	4,92±0,91aB	4,68			
Média Geral		4,29	4,30	4,56	5,68				
Colesterol (mmol/L)	G1	5,12±1,38	4,140,79	3,95±1,07	5,12±1,53	4,56A	0,8546	0,0032	0,1166
	G2	5,54±1,44	4,61±1,28	3,98±0,94	4,02±0,93	4,53A			
Média Geral		5,34 ^a	4,38b	3,97b	4,54b				
Triglicérides (mmol/L)	G1	2,75±1,87	5,38±2,25	3,92±2,45	3,05±1,50	2,95B	0,0237	0,0002	0,4603
	G2	2,80±0,68	4,17±1,85	2,45±1,07	2,37±1,24	3,83A			
Média Geral		2,78b	4,77a	3,12b	2,68b				
Atividade Enzimática									
AST (U/L)	G1	37,05±30,28	46,19±40,23	53,50±54,27	33,08±22,10	42,22A	0,2435	0,0966	0,6769
	G2	17,38±11,19	37,85±24,20	50,75±30,88	24,17±12,93	32,54A			
Média Geral		27,21 ^a	42,02a	52,06 ^a	28,62a				
FA (U/L)	G1	45,75±18,85	25,13±7,91	39,53±19,95	25,19±14,54	33,11A	0,8278	0,0008	0,6514
	G2	39,65±17,17	26,00±9,88	34,44±16,63	28,41±13,98	31,82A			
Média Geral		42,36 ^a	25,63b	36,73b	26,80b				
LDH (U/L)	G1	1806,2±755,9	2192,5±832,6	1611,4±602,4	2549,4±5132	2065,2A	0,4825	0,0152	0,5740
	G2	1558,6±582,8	1818,2±654,6	1997,2±839,1	2225,0±381,9	1877,2A			
Média Geral		1675,10b	1963,80b	1828,40b	2407,40a				

Letras minúsculas distintas na mesma linha e letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem ao nível de 5% de probabilidade.

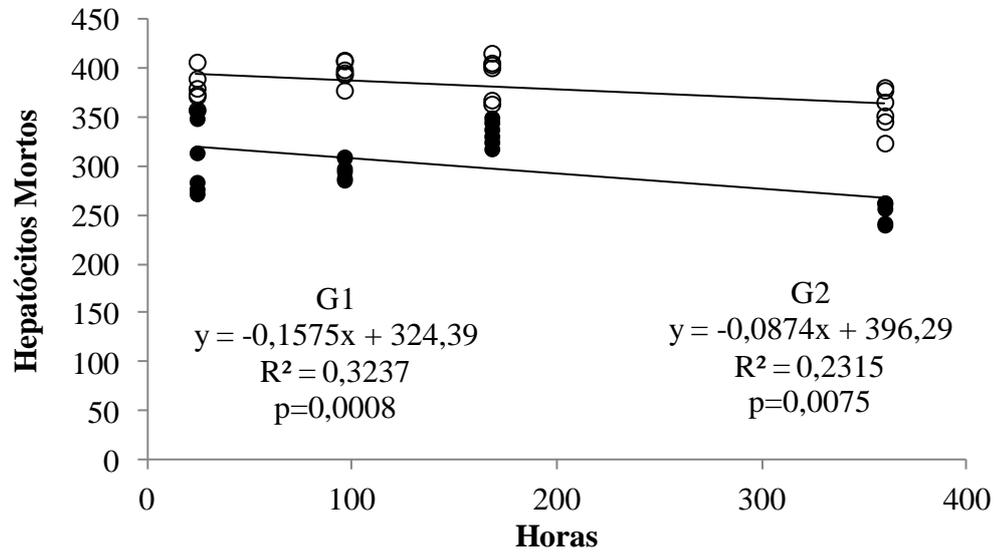


Figura 1 – Perfil da análise de regressão, em função das horas, do número de hepatócitos mortos de peixes expostos ou não por inseticida Tiametoxam

Na análise histopatológica as alterações encontradas com maior frequência foram vacuolização citoplasmática, necrose hepática e pancreática, infiltrado inflamatório no parênquima hepático e pancreatite, observadas tanto nos grupos controle quanto nos animais expostos, com diferenças entre frequência de ocorrência (Tab3; Fig 2).

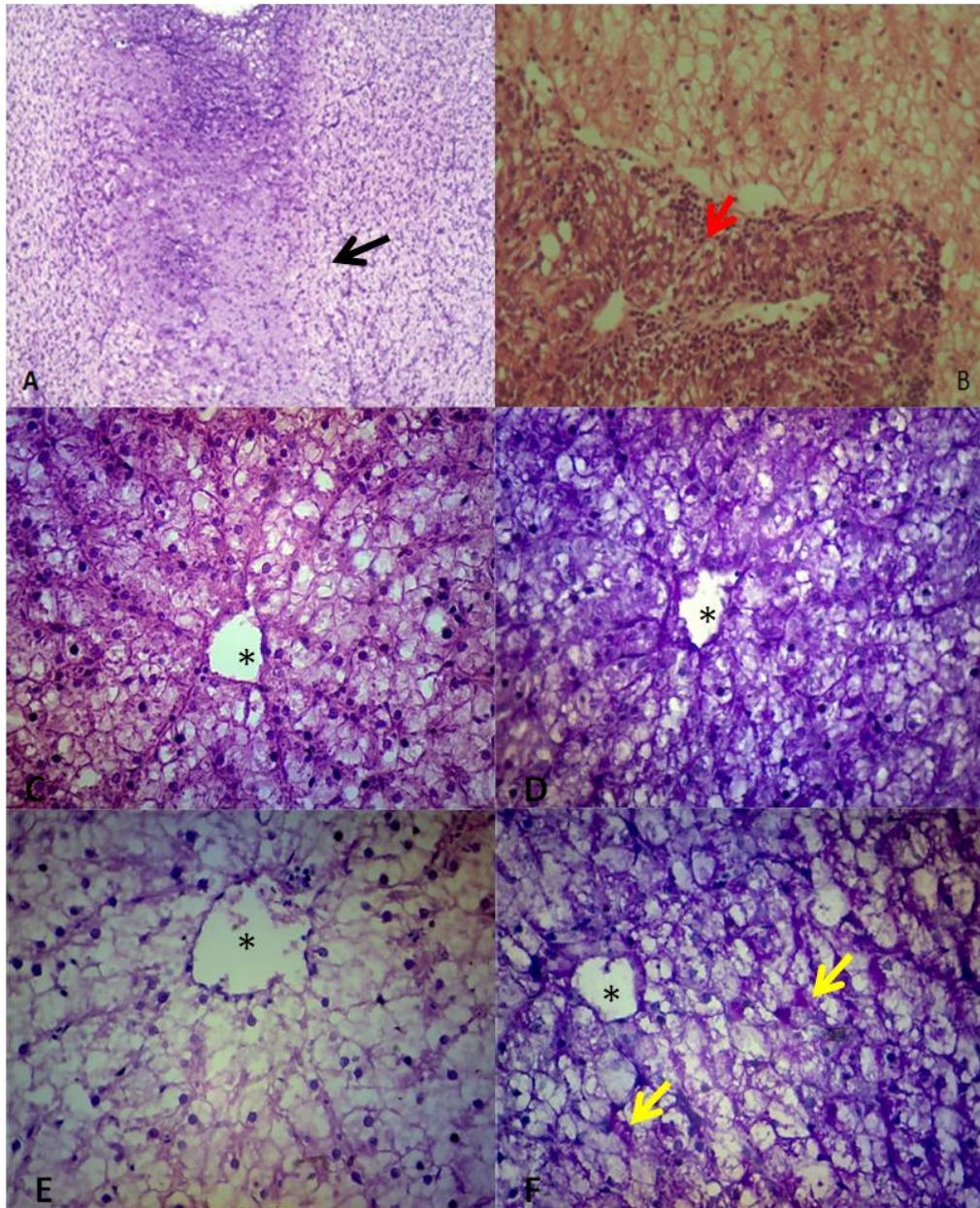


Figura 2. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático de tilápias do Nilo expostas ao tiametoxam. Em A, extensa área de necrose (seta preta)(HE-obj 10x). Em B, tecido pancreático com infiltrado inflamatório mononuclear (seta vermelha)(HE – obj.40x). Em C, vacuolização grau 2 (HE - obj. 40x). Em D, vacuolização grau 2 sem reação ao PAS (PAS, obj. 40x). Em E, vacuolização grau 3 (HE – obj. 40x). Em F, vacuolização grau 3 com poucas áreas positivas ao PAS (seta amarela) (PAS, obj.40x). * - veia central.

Tabela3. Distribuição percentual e absoluta das alterações hepáticas de acordo com o grupo, o tempo e a graduação

Grupos	Graduação	Vacuolização	Necrose hepática	Necrose pancreática	Infiltrado inflamatório hepático	Infiltrado inflamatório pancreático
G1 24h	Ausência	-	-	-	100% (6)	16,7% (1)
	Grau 1	-	33,3% (2)	-	-	33,3% (2)
	Grau 2	33,3% (2)	66,7% (4)	33,3% (2)	-	50% (3)
	Grau 3	66,7% (4)	-	66,7% (4)	-	-
G2 24h	Ausência	-	-	-	50% (3)	-
	Grau 1	-	16,7% (1)	-	33,3% (2)	83,3% (5)
	Grau 2	33,3% (2)	16,7% (1)	66,7% (4)	16,7% (1)	16,7% (1)
	Grau 3	66,7% (4)	66,7% (4)	33,3% (2)	-	-
G1 96h	Ausência	-	-	16,7% (1)	33,3% (2)	50% (3)
	Grau 1	16,7% (1)	66,7% (4)	33,3% (2)	50% (3)	50% (3)
	Grau 2	33,3% (2)	33,3% (2)	33,3% (2)	16,7% (1)	-
	Grau 3	50% (3)	-	16,7% (2)	-	-
G2 96h	Ausência	-	-	-	-	-
	Grau 1	-	33,3% (2)	33,3% (2)	33,3% (2)	66,7% (4)
	Grau 2	16,7% (1)	16,7% (1)	50% (3)	66,7% (4)	33,3% (2)
	Grau 3	83,3% (5)	50% (3)	16,7% (1)	-	-
G1 168h	Ausência	-	-	-	33,3% (2)	33,3% (2)
	Grau 1	-	66,7% (4)	100% (6)	50% (3)	50% (3)
	Grau 2	50% (3)	33,3% (2)	-	16,7% (1)	16,7% (1)
	Grau 3	50% (3)	-	-	-	-
G2 168h	Ausência	-	-	-	16,7% (1)	16,7% (1)
	Grau 1	33,3% (2)	16,7% (1)	33,3% (2)	66,7% (4)	50% (3)
	Grau 2	33,3% (2)	16,7% (1)	66,7% (4)	16,7% (1)	33,3% (2)
	Grau 3	33,3% (2)	66,7% (4)	-	-	-
G1 360h	Ausência	-	16,7% (1)	-	16,7% (1)	33,3% (2)
	Grau 1	33,3% (2)	50% (3)	100% (6)	83,3% (5)	66,7% (4)
	Grau 2	33,3% (2)	33,3% (2)	-	-	-
	Grau 3	33,3% (2)	-	-	-	-
G2 360h	Ausência	-	-	-	33,3% (2)	33,3% (2)
	Grau 1	66,7% (4)	16,7% (1)	33,3% (2)	50% (3)	66,7% (4)
	Grau 2	16,7% (1)	66,7% (4)	66,7% (4)	16,7% (1)	-
	Grau 3	16,7% (1)	16,7% (1)	-	-	-

A maioria dos animais apresentava grau 3 de vacuolização nas primeiras 24 horas, independente do grupo, após 96 horas, o número de animais do grupo exposto aumentou no grau de vacuolização 3. Com 168 horas de experimento, a distribuição entre os graus de vacuolização estava homogênea e ao final do período experimental, com 360 horas, o grupo exposto apresentava uma maior quantidade de animais com grau 1 de vacuolização.

Em relação a necrose hepática, em todos os tempos, a maioria dos animais apresentou um grau superior da alteração em relação aos controles, havendo também uma tendência na diminuição da ocorrência de necrose no período de 360 horas em relação aos demais tempos, fato também confirmado com a morfometria.

A necrose pancreática também apresentou uma maior severidade nos animais expostos em relação ao controle na maioria dos tempos. A presença de infiltrado inflamatório no parênquima hepático e no pâncreas, apareceu em ambos os grupos de forma focal, permanecendo a maioria dos animais com uma graduação 1.

Na análise morfométrica, verificou-se um maior número de pontos de interseção sobre hepatócitos mortos nos peixes do grupo exposto (G2) em relação ao controle (G1) em todas as horas de observação. No contraste das médias entre horas, dentro do G1, foi possível identificar maior concentração de pontos sobre hepatócitos mortos após 168 horas, diferindo de 24 e 96 horas, sendo os três tempos maiores que o tempo de 360 horas. Quanto ao G2, maiores médias foram identificadas nos tempos 24, 96 e 168 horas, diferindo do tempo 360 h (Tab 4). Foi também registrada interação significativa entre Grupos e Horas para a contagem de pontos de interseção sobre hepatócitos mortos ($p=0,0201$) (Fig 1).

A reação ao PAS foi fracamente positiva, relevando presença de pouca quantidade de glicogênio nos vacúolos, o que pode indicar a presença de gordura ou degeneração hidrópica.

Tabela 4. Valores médios, desvios-padrão e nível de significância (*p*) dos fatores de variação da contagem de hepatócitos mortos do fígado de Tilápia do Nilo expostos ou não por inseticida Tiametoxam.

Parâmetros	Grupos	Horas				Média	Fatores de variação		
		24	96	168	360	Geral	Grupos	Horas	G x H
Perfil energético									
Hepatócitos Mortos	G1	299,00±37,27Bb	296,50±10,17Bb	334,50±12,15Ba	259,50±10,71Bc	297,75	<.0001	<.0001	0,0201
	G2	377,00±16,81Aa	397,50±11,31Aa	402,50±21,67Aa	359,00±21,58Ab	387,25			
Média Geral		338,00	347,00	368,50	309,25				

Letras minúsculas distintas na mesma linha e letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem ao nível de 5% de probabilidade.

Discussão

No presente trabalho tanto na análise semiquantitativa das alterações histológicas quanto na morfométrica pode-se observar que as alterações foram também encontradas no grupo controle, porém com uma maior ocorrência nos animais expostos. Wolf e Wolfe (2005) relataram que características morfológicas de toxicidade hepática são geralmente exacerbações de achados que podem ser observados em peixes normais ou controle e por esse motivo, Wolf et.al (2015) aconselharam o uso de métodos semiquantitativos para avaliação da severidade dos achados. Marcon (2013) estudando lambaris expostos ao inseticida endosulfan relatou alterações como deformação do contorno nuclear, núcleo na periferia da célula, atrofia nuclear, desarranjo dos cordões hepáticos e hipertrofia celular e nuclear observadas nos grupos controles e nos expostos, sendo que nestes com maior frequência.

Stoyanova et al (2016), estudando carpas cabeçudas expostas a 6,6; 10 e 20mg/L de tiametoxam por 96 horas observaram a ocorrência de mudanças degenerativas e necróticas no fígado, além de hiperemia e infiltrado linfocítico, sendo que o grau de expressão de cada lesão aumentou proporcionalmente com o aumento das concentrações de tiametoxam. Os mesmos autores relataram que na análise histoquímica, a quantidade de lipídeos nos hepatócitos dos peixes expostos ao tiametoxam tenderam a aumentar as inclusões lipídicas no citoplasma em paralelo ao aumento das concentrações do inseticida. Stoyanova et al (2015) identificaram nos mesmos animais que a quantidade de glicogênio hepático aumentou com o aumento da concentração do tiametoxam, o que nas mesmas condições também foi observado para carpas comuns(Stoyanova, 2012).

Carraschi (2014) estudando pacus infestados com *Anacanthorus penilabiatus*, submetidos a um tratamento experimental com tiametoxam 75mg/L por sete dias, observou em peixes doentes e tratados com o inseticida e também nos peixes sadios submetidos ao mesmo tratamento, alterações hepáticas como aumento do diâmetro dos capilares sinusóides e hipertrofia dos hepatócitos. Nos animais doentes tratados, o glicogênio hepático apareceu em maior quantidade, enquanto nos animais sadios expostos, o glicogênio apresentou disposição polar, com parte do citoplasma claro e o outro extremo com estoque de glicogênio.

As vacuolizações hepáticas representam armazenamento de glicogênio e lipídeos e podem ocorrer quando a tomada de energia excede os requerimentos metabólicos. O fígado de peixes tende a estocar o excesso de energia em forma de glicogênio e ou lipídeo no citoplasma dos hepatócitos. Isso é comum em peixes de cultivos que são alimentados com

rações calóricas e não tem muitos gastos energéticos. A predileção para acumular glicogênio ou lipídeo é espécie dependente e pode estar relacionada à dieta (Wolf et al. 2015).

O glicogênio é um nutriente muito utilizado em adaptações bioquímicas em situações de estresse ambiental (Portz e Furuya, 2012). Peixes doentes, estressados ou malnutridos frequentemente exibem uma redução nos estoques hepáticos de energia, diminuindo a vacuolização hepatocelular (Wolf et al. 2015) e essa é uma resposta morfológica hepática comum em peixes expostos a agentes tóxicos (Ferguson 1989). Essa perda pode ocorrer como efeito direto da intoxicação, no entanto, a exposição a agentes tóxicos pode também resultar em acúmulo de gordura ou glicogênio hepático, com a hipótese de ser resultante do decréscimo de quebra de glicogênio devido a toxicidade hepatocelular (Wolf e Wolfe 2005).

A avaliação morfométrica mostrou que apesar da ocorrência de grande quantidade de pontos de interseção sobre hepatócitos mortos ter ocorrido no grupo controle, houve uma diferença estatisticamente significativa dessa ocorrência entre expostos e controle, sendo que em todos os tempos, houve uma maior quantidade de pontos de interseção sobre hepatócitos mortos nos animais expostos. Na análise semiquantitativa, em todos os tempos, a maioria dos animais apresentaram um grau superior de necrose hepática e pancreática em relação aos seus controles. A necrose é uma alteração que pode estar associada a várias condições tóxicas, incluindo pesticidas, podendo aparecer de forma isolada entre o tecido hepático normal ou infiltrado por células inflamatórias (Roberts 2012). Diversos autores relataram a ocorrência de necrose hepática em peixes expostos a agrotóxicos, como em tilápias do Nilo alimentadas com 1.45 g/l de deltametrina (Kan et al. 2012), *Heterobranchus bidorsalis* expostos a cipermetrina (Olufayo&Alade 2012) e *Poecilia reticulata* expostos a 250 µg/L de rotenona (Melo et al. 2015).

A capacidade de peixes em sobreviver a necroses hepáticas extensas é sugestivo de que eles podem ser um valioso modelo animal para estudos de toxicidade hepática subletal e regeneração hepática (Wolf e Wolfe, 2005). Nos achados desse experimento, houve uma diminuição do número de pontos de interseção sobre hepatócitos mortos após 360 horas de exposição, além da diminuição do grau de severidade nos animais expostos no mesmo período, o que pode estar refletindo essa capacidade regenerativa do fígado.

Em relação aos parâmetros bioquímicos avaliados, pode-se observar uma diminuição da proteína total e um aumento dos triglicerídeos dos animais expostos em relação ao controle. Alkaladi et.al (2015) observou hipoproteïnemia em todos os grupos expostos a nanopartículas de óxido de zinco. Asgah et al (2015) também observou uma diminuição no nível de proteína sérica e um aumento no nível de lipídeos em tilápias expostas a diferentes

concentrações de cádmio, o que foi atribuído pelos autores a uma possível inibição de síntese hepática das proteínas e um distúrbio no metabolismo de lipídeos. Os resultados encontrados nesse trabalho podem também ser reflexo de uma inibição na síntese de proteínas ou um desvio no metabolismo energético, como uma lipogênese.

A energia que sustenta as funções metabólicas nos peixes são basicamente oriundas das fontes de lipídios, juntamente com as proteínas os quais representam os principais nutrientes essenciais para esses animais, sendo os triglicerídeos, a principal classe de lipídios neutros. Nos casos de lipogênese, a fonte de carbono final para a biossíntese de novos lipídios é a acetil-Coa formada na mitocôndria a partir da descarboxilação oxidativa do piruvato (fonte carboidrato) ou pela degradação oxidativa de alguns aminoácidos (fonte proteína). O fígado é quantitativamente, o principal local de lipogênese. Além disso, em termos de fonte de carbono, a taxa de síntese de ácidos graxos a partir de alanina é considerado maior do que o da glicose em fígado de trutas, sugerindo que amino ácidos são fontes de carbono preferenciais para lipogênese nessa espécie. Quantidades moderadas de lipídios pode ser armazenada no fígado em muitos peixes, apesar de ser um estoque de curto prazo quando comparado com o tecido adiposo. Os lipídeos são provavelmente mobilizados primeiramente de um tecido adiposo, apesar de a longo prazo, poderá também ser mobilizado de uma fonte de estoque secundária, como músculo e fígado (Tocher, 2003).

Em tilápias expostas a 12,5; 25; 50; 100 e 150mg/L de tiametoxam por 7 e 14 dias foi observado uma diminuição gradativa do peso dos animais, a medida que a concentração do inseticida aumentava. A proteína hepática foi significativamente menor em todas as concentrações e nos dois períodos em comparação ao controle. Entre os animais expostos, no primeiro momento houve um aumento da proteína hepática entre 12,5; 25 e 50 mg/L, seguido de um decréscimo em 100mg/L, provavelmente devido ao efeito do inseticida e tentativa de recuperação frente ao agente estressor. Na dose mais alta, o decréscimo pode estar relacionado a depleção da fração proteica do fígado pela sua degradação e utilização para propósitos metabólicos (Bose et al; 2011).

Poucos estudos foram realizados com a análise de parâmetros bioquímicos em peixes expostos ao tiametoxam, dentre estes podemos destacar o estudo realizado por Stoyanova et al. (2016), que observaram em carpas cabeçudas expostas a 6,6; 10 e 20mg/L por 96 horas um aumento nas enzimas AST, ALT e LDH nos animais expostos em relação ao controle e proporcional ao aumento das concentrações utilizadas. Yan et al.(2015) relataram em zebrafish expostos a 0,30;1,25 e 5,0 mg/L por 7, 14, 21 e 28 dias, uma ascensão das espécies reativas a oxigênio (ROS) no período de exposição, um aumento dramático de superóxido

dismutase (SOD) e catalase(CAT) até os 14 dias e uma queda após este período, além da Glutathione S- transferase (GST) que aumentou somente aos 28 dias.

Apesar dos resultados demonstrados por outros autores, no presente experimento no que se refere a atividade enzimática foi observada uma diferença estatística somente entre os tempos amostrais, onde a FA apresentava valores mais elevados na primeira coleta e o LDH na última coleta, em relação aos demais tempos, o que parece ser reflexo do estado dos peixes antes mesmo do início do experimento. A enzima lactato desidrogenase tem sido abordada em vários estudos com peixes, uma vez que está diretamente ligado à via glicolítica e metabolismo anaeróbico, responsável por respostas de estresse ambiental.

Outros parâmetros como colesterol, uréia e creatinina apresentaram diferenças somente entre os períodos, onde de forma geral foram observados valores mais altos nas primeiras 24 horas, que diminuíram nos demais tempos.

Conclusões

Concentrações subletais de tiametoxam são capazes de provocar toxicidade em tilápias do Nilo, visto que a dinâmica de alguns biomarcadores, como a proteína total e triglicerídeos séricos, são influenciados pela ação deste inseticida, bem como alterações de tecido hepático, tanto na análise semiquantitativa quanto na morfometria, uma vez que necrose hepática aparece de forma mais intensa nos peixes expostos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida à primeira autora (IBPG -0903-5.05/11).

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela realização da microscopia eletrônica de transmissão.

Referências

AGROFIT- Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <<http://agrofit.com.br>>. Acessado em: 12 abril 2016.

AL-ASGAH, N.A.; ABDEL-WARITH, A.W.A.; YOUNIS, E.M. et al. Haematological and biochemical parameters and tissue accumulations of cadmium

in *Oreochromis niloticus* exposed to various concentrations of cadmium chloride. *Saudi J Biol Sci.* v.22,n.5,p. 543–550, 2015.

ALKALADI, A.; NASREL-DEEN, N.A.M.; AFIFI, M. et al. Hematological and biochemical investigations on the effect of vitamin E and C on *Oreochromis niloticus* exposed to zinc oxide nanoparticles. *Saudi J Biol Sci.* v.22,n.5, p. 556–563, 2015.

BOSE, S.; NATH, S; SAHANA, S.S. Toxic impact of tiametoxam on the growth performance and liver protein concentration of a freshwater fish *Oreochromis niloticus* (trewavas). *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences.* v. 1, n.4, p.274-280, 2011.

CARRASCHI, S.P. Ecotoxicidade, segurança clínica e eficácia de fármacos em jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2014. Tese doutorado em aquicultura. Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p.101.

FERGUSON H. 1989. Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Iowa State University Press, Iowa, 263p

FIRAT, O.; COGUN, H.Y.; YU˘ZEREROG˘LU, T.A. et al.. A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem*, v.37,p.657–666, 2011.

FONTAINHAS-FERNANDES, A.A. Tilapia production. In: REIS-HENRIQUES MA(ed) *Aquaculture Handbook*. P.135-150. 1998.

KAN, Y., CENGIZ, E.I., UGURLU, P. et al. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to Deltamethrin. *Environmental toxicology and pharmacology.* v.34,p.170–179,2012.

MAIENFISCH, P.; ANGST, M.; BRANDL, F. et al. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest. Manag. Sci.*, v.57, n.10, p.906-913, 2001.

MARCON, L. Efeitos do thiodan® em fígado e em ovários em maturação avançada de lambaris *Astyanax bimaculatus*. 2013. 108f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MELO K. M., OLIVEIRA R., GRISOLIA C. K. et al. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. *Environ Sci Pollut Res.* v.22,p.13926–13938,2015.

OLUFAYO M. O., ALADE O. H. Acute toxicity and histological changes in gills, liver and kidney of catfish, *Heterobranchus bidorsalis* exposed to cypermethrin concentration. *African Journal of Agricultural Research.* v7,n.31,p.4453-4459, 2012

PORTZ, L.; FURUYA,W.M. Energia , proteína e aminoácidos. In:FRACALOSSI,D.M.;CYRINO,J.E.P. Nutriaqua:nutrição e alimentação de espécies de interesse para aquicultura brasileira.Florianópolis, Sociedade Brasileira de aquicultura e Biologia Aquática,p.65-78.2012.

ROBERTS R. J. 2012. Fish Pathology. Wiley-Blackwell, London, 583p.

SINGH, D.K. 2012. Pesticide Chemistry and Toxicology. Índia, Bentham Science Publishers, 150p.

STOYANOVA S., GEORGIEVA E., VELCHEVA I et al. Effects of the insecticide “actara 25 wg” on the glyconeogenesis in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*L.). *J. Biosci. Biotech.* v. 1, n.3,p. 249-254, 2012.

STOYANOVA,S.;YANCHEVA,V.;ILIEV,I. et al. Biochemical, histological and histochemical changes in *Aristichthys nobilis* Rich. liver exposed to thiamethoxam. *Periodicum Biologorum*,v.118,n.1,p.29-36.2016.

STOYANOVA,S.;YANCHEVA,V.;VELCHEVA,I et al. Thiamethoxam causes histochemical changes in the liver of *Aristichthys nobilis* Rich.,1845. *J. BioSci. Biotechnol.* V.4,n.3,p.321-325, 2015.

TOCHER, D.R. Metabolism and Functions of lipids and fatty acids in Teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, v.11,n.2,p.107-184. 2003.

UĞURLU, P.; ÜNLÜ, E.; SATAR, E.I. The toxicological effects of thiamethoxam on *Gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937) (Crustacea: Amphipoda). *Environmental Toxicology and Pharmacology.*, v.39, p.720-726, 2015.

WOLF J.C., BAUMGARTNER W.A., BLAZER V.S. et al. Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and reader. *Toxicol. pathol.* v.43, n.3, p.297-325, 2015.

WOLF J.C., WOLFE, M. J. A brief overview of non-neoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol. Pathol.* v.33, n.1, p.75–85, 2005.

YAN, S.H.; WANG, J.H.; ZHU, L.S. et al. Thiamethoxam induces oxidative stress and antioxidant responses in Zebrafish (*Danio Rerio*) livers. *Environmental Toxicology* doi: 10.1002/tox.22201. 2015.

3º Artigo

O 3º artigo foi submetido para o periódico **Pesquisa Veterinária Brasileira**(normas em anexo).

TOXICIDADE DO INSETICIDA TIAMETOXAM PARA O PACAMÃ (*Lophisulurus alexandri*)

Toxicidade do inseticida Tiametoxam para o Pacamã (*Lophisilurus alexandri*)

Ana C. L. Albinati^{1*}, Pierre C. Soares², Ricardo C. B. Albinati³, Eduardo L.T. Moreira³, Alessandra D. Lira⁴, Jaciane V. Carvalho⁵

1Colegiado de Medicina Veterinária, Universidade do Vale do São Francisco, Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n, C1, CEP: 56300-990, Petrolina, PE, Brasil. * Autor para a correspondência: catarina.albinati@gmail.com

2 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, PE, Brasil.

3 Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Av. Ademar de Barros, n. 500, Ondina, CEP: 40170-110, Salvador, BA, Brasil

4 Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos em Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43.212, Campus do Vale, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

5 Médica Veterinária autônoma.

RESUMO.-Este estudo avaliou a toxicidade aguda e crônica de um inseticida a base de tiametoxam para peixes da espécie Pacamã (*Lophisilurus alexandri*), avaliando a CL50% 96 horas além de alterações histopatológicas hepáticas em animais expostos por 96 horas e 15 dias ao inseticida. Para tanto foram utilizados 120 alevinos de Pacamã que foram submetidos a cinco diferentes concentrações do inseticida (30, 60, 120, 240 e 480 mg/L) por 15 dias, divididos em dois tempos amostrais, 96 horas e 15 dias. Não houve mortalidade significativa durante todo o período experimental, no entanto os animais apresentaram alterações como vacuolização citoplasmática, congestão e necrose. A CL50% foi determinada como superior a 100mg/L, considerada praticamente não tóxica. A necrose foi a alteração melhor evidenciada nos animais expostos, com o aumento da ocorrência nos animais do teste de toxicidade crônica.

TERMOS DE INDEXAÇÃO. Inseticida, peixes, pacamã, tiametoxam, toxicidade

ABSTRACT.-This study evaluated the acute and chronic toxicity of an insecticide thiamethoxam base for fish Pacamã species (*Lophisilurus alexandri*), assessing the CL50% 96 hours addition to liver histopathological changes in animals exposed for 96 hours and 15 days to the insecticide. Therefore, we used 120 Pacamã fingerlings were subjected to five different concentrations of insecticide (30, 60, 120, 240 and 480 mg / L) for 15 days were divided into two sampling times, 96 hours and 15 days. There was no significant mortality during the experimental period, however the animals showed changes as vacuolation, congestion and necrosis. The LC50% was determined as greater than 100mg / L, considered practically non-toxic. Necrosis was best demonstrated the change in the exposed animals, with increasing occurrence in animal chronic toxicity test.

INDEX TERMS. Insecticides, fish, pacamã, thiamethoxam, toxicity

INTRODUÇÃO

Na última década o mercado de agrotóxicos no Brasil expandiu rapidamente, levando o país a alcançar a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos desde 2008 (Londres 2011, Rigotto et al., 2014). Considerando diferentes regiões do Brasil, as quais fazem uso significativo de agrotóxicos, a região do submédio São Francisco, na região Nordeste do Brasil, tem se destacado como uma das principais áreas de exploração e exportação da hortifruticultura irrigada do país, tendo mais de 51% da sua população economicamente ativa empregada na agricultura. A produção de manga e uva irrigadas aparece como principais monoculturas na região e são exploradas por grandes e pequenos agricultores. Devido ao tipo de produção predominante, a principal classe de agrotóxicos utilizada na região é a inseticida (56%) e entre os agrotóxicos mais vendidos na região está um inseticida a base de tiametoxam (Bedor 2007).

O tiametoxam é um inseticida neonicotinóide de segunda geração, com potencial tóxico para o meio ambiente (classe ambiental III). O mecanismo de ação do Tiametoxam ocorre por meio de ligação nos receptores nicotínicos da acetilcolina (Maiennfisch 2001). Essa nova geração de inseticidas veio substituir os organofosforados e carbamatos, os quais têm diminuído a sua eficiência e vem sendo menos utilizados, em função do aumento das restrições de seu uso (Tavares 2011). Segundo Silva et al. (2014) o tiametoxam é um composto considerado moderadamente persistente no solo, não sofre lixiviação para

água subterrânea e possui baixo potencial de transporte em água quando associado a sedimento, porém um alto potencial quando dissolvido em água. Pouco se sabe a respeito da toxicidade de neonicotinóide para os organismos de água doce não alvo e seu potencial efeito nesse ecossistema (Uğurlu et al. 2015).

Tem sido indicado para uso em diversas culturas agrícolas e tem sido prospectado para o uso terapêutico em aquicultura (Carraschi et al. 2014). Alguns autores consideram o tiametoxam praticamente não tóxico para peixes (Maeinfisch 2001) no entanto, ainda são poucos os estudos realizados sobre os efeitos do tiametoxam com esses animais.

O pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) é um peixe carnívoro, de hábito bentônico, espécie não migradora e de desova parcelada (Tenório 2006). É uma das espécies endêmicas da Bacia do Rio São Francisco (Figueiredo 2014) e com crescente interesse comercial nessa região (Campeche et al. 2011).

Alterações histológicas em tecidos de peixes constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (Schwaiger et al. 1997). Lins (2012) ressalta que órgãos de contato direto com o agente agressor, como as brânquias e os órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos – como o fígado e o rim, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais.

Considerando os aspectos endêmicos do pacamã na região do Vale do São Francisco no Nordeste brasileiro, com evidente característica comercial para consumo humano, além de escassez de informação na literatura a respeito da toxicidade de neonicotinóide para a espécie em questão, objetivou-se avaliar a toxicidade aguda e crônica de inseticida a base de tiametoxam, por meio da concentração letal 50% (CL₅₀) e de eventuais alterações histológicas em tecido hepático de pacamãs.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento conduzido foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob o número 36/2014.

Foram utilizados 120 alevinos de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) provenientes da fazenda da Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco (CODEVASF) em Petrolina – PE. Os animais apresentavam peso médio de 5,0±0,35g, e estavam clinicamente hígidos. Os mesmos foram transportados de carro, acondicionados em sacos plásticos com água e injetados de oxigênio, da fazenda da Codevasf em Petrolina até o Laboratório de Aquicultura e Sanidade de Organismos Aquáticos (LASOA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA, onde foi realizado o experimento. Ao chegarem, foram colocados em tanques de fibra de vidro de 500L, com aeração artificial, onde foram mantidos para aclimação por 10 dias. Os animais foram alimentados com ração formulada e preparada de acordo com os resultados de dissertação que comparou dietas para a espécie (ROCHA, 2014) e apresentava a seguinte composição bromatológica em valores expressos em 100% de Matéria Seca, umidade 0,5%; proteína bruta 49,4%; extrato etéreo 16,8% e cinzas 13,8%.

O inseticida utilizado foi o Actara 250WG®, produto comercial à base de tiametoxam, comercializado pela Syngenta Proteção de Cultivos LTDA. Na sua composição estão presentes 250g/kg de 3-(2-Cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5] oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina e 750g/kg de ingredientes inertes.

Os parâmetros de qualidade da água como oxigênio dissolvido, pH e temperatura foram mensurados diariamente em todos os tanques.

Para a realização do experimento, os peixes foram distribuídos aleatoriamente em 24 caixas plásticas com 20L de água de clorada, com aeração artificial. O experimento foi realizado em sistema estático, sem renovação da água. Foram utilizados cinco peixes por caixa, perfazendo um total de 20 peixes por tratamento. Foram utilizadas cinco diferentes concentrações do inseticida e um controle (T₀), com quatro repetições por tratamento. As concentrações nominais utilizadas foram 30(T₁), 60(T₂), 120(T₃), 240(T₄) e 480(T₅) mg/L do Actara 250WG®.

A primeira etapa do experimento teve a duração de 96 horas, com observação e quantificação de mortalidade a cada 24 horas. Ao final das 96 horas foram selecionados, aleatoriamente, dois animais por caixa para coleta de material para análise histológica e os outros três peixes foram mantidos na mesma solução até completarem 15 dias de exposição. Ao final dos 15 dias foram selecionados novamente dois peixes de cada caixa para coleta de material para análise microscópica. Na primeira etapa do experimento os animais não foram alimentados, de acordo com as recomendações das normas de ensaio de toxicidade aguda com peixes, da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (ABNT, 2011). A alimentação voltou a ser ofertada após as 96 horas iniciais.

Imediatamente após a eutanásia dos peixes, por aprofundamento anestésico (benzocaína), foi feita a coleta do fígado para análise histológica. Os fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10% e processados segundo a técnica rotineira de inclusão em parafina (Prophet 1992). A coloração utilizada foi hematoxilina e eosina (HE) e alguns cortes foram submetidos à técnica histoquímica do ácido periódico de Schiff (PAS), de acordo com Luna(1960) para confirmar a presença de glicogênio. Utilizaram-se seis animais de cada concentração para análise histológica.

Secções de 5 μ de espessura foram analisadas por meio de microscopia óptica e as alterações encontradas foram classificadas individualmente de acordo com o grau da lesão no tecido. Foi utilizado um sistema de graduação semiquantitativa, que variou de um a três, sendo 1- mínimo, 2-moderado, 3-severo, além do zero quando não se observou a alteração no tecido. Os dados foram avaliados por meio de dispersão de frequência absoluta, bem como registro descritivo das lesões observadas na histologia e histoquímica.

RESULTADOS

A qualidade da água manteve-se dentro da normalidade para espécies de clima tropical durante todo o período experimental, em todas as unidades experimentais, com um pH médio de $7,6\pm 0,06$; oxigênio dissolvido (OD) de $6,9\text{ mg/L}\pm 0,20$ e uma temperatura de $27,1^{\circ}\text{C}\pm 0,10$. A determinação exata da CL50 96 horas não foi realizada, uma vez que não houve nenhum óbito no tempo e nas concentrações utilizadas, porém com as informações obtidas nesse experimento pode-se considerar a CL50% superior a 100mg/L.

As principais alterações encontradas no fígado foram vacuolização citoplasmática, congestão e necrose. As graduações referentes a vacuolização hepatocelular, variaram do grau 0 ao 3 e as alterações apareceram de forma geral como extensas áreas cujas células de aspecto baloniforme, continham vacúolos intracitoplasmáticos claros ou com presença de material floculento (Figura 1). Quanto ao grau de vacuolização entre os animais do grupo controle e os expostos, tanto no teste agudo quanto no crônico, foi possível registrar no teste agudo que 55,6% apresentavam grau 2 de vacuolização, enquanto que no teste crônico 80,6% apresentavam grau 3 de vacuolização.

Na reação ao ácido periódico de Schiff (PAS), independente de ser animal exposto ou do controle, foi observado uma maior positividade nos animais que apresentaram grau de vacuolização entre 0 e 1. Os animais com vacuolizações grau 2 e 3 apresentaram menor positividade até a ausência de qualquer reação ao PAS(Figura 1).

A presença de congestão variou do grau 0 ao 3, caracterizando-se pela presença de grande quantidade de hemácias em vasos e capilares sinusoidais dilatados, porém a distribuição dessa alteração dentre os grupos se apresentou de forma homogênea. Já em relação a presença de necrose, observou-se variação entre o grau 0 e 2, com distribuição focal a multifocal, mostrando dissolução tecidual com hemorragia e presença de células com núcleos em picnose(Figura 2). No teste de toxicidade aguda, 40% dos animais expostos apresentaram necrose, sendo que entre esses 75% foram classificadas em grau 1 e 25% no grau 2 e apenas 1 animal do grupo controle apresentou a mesma alteração. No teste de toxicidade crônica, a necrose apareceu em 66,7% dos animais expostos ao inseticida, sendo 45% classificadas no grau 1 e 55% no grau 2. Nesse período, nenhum animal do grupo controle apresentou necrose.

Na figura 3 é possível observar a distribuição da frequência absoluta entre o número de animais com necrose no grupo controle e expostos, assim como o aumento na ocorrência dessa alteração com o maior tempo de exposição.

DISCUSSÃO

Em relação à toxicidade do agrotóxico de acordo com sua CL50, Zucker (1985) afirma que um agrotóxico é considerado praticamente não tóxico quando a CL50 > 100mg/L. Nesse experimento não ocorreu nenhum óbito nas concentrações estudadas, sendo considerado, portanto, que o tiametoxam é praticamente não tóxico para pacamãs, sem a necessidade de repetir o experimento com concentrações mais elevadas. Fulton et al. (2014) afirmam que a toxicidade aguda de neonicotinóides para peixes é baixa, enquanto que Barbee & Stout (2009) reportaram, tanto para truta arco-iris quanto para bluegillsunfish, valores de CL50 superiores a 100mg/L e 114mg/L, respectivamente. Em tilapias do Nilo foi encontrado por Albinati et al. (2014), CL50 de 322,08mg/L. No entanto, algumas espécies apresentam uma maior sensibilidade como o pacu, que apresentaram CL50 de 16,97mg/L e o Mato Grosso com 49,78mg/L (Carraschi et al. 2015). Cabe ressaltar que apenas um pequeno número de espécies de peixes tem sido avaliado quanto à sensibilidade a neonicotinóides (Anderson et al. 2015).

Embora no teste de toxicidade aguda o tiametoxam tenha se comportado como um inseticida praticamente não tóxico para o pacamã, ressalta-se que nem todos os pesticidas provocam morte imediata dos peixes e doses subletais podem causar mudanças comportamentais, perda de peso, queda na resistência e redução da resposta imunológica, dentre outros problemas (Helfrich et al. 1996).

As alterações histopatológicas encontradas nesse trabalho são concordantes com as relatadas por Viana et al.(2013), quando estudaram peixes coletados de zonas de risco de um estuário amazônico, encontrando como principais alterações a degeneração gordurosa, congestão e necrose focal. Em levantamento realizado por Santos-Filho et al.(2014), a vacuolização foi a alteração hepática mais frequente encontrada em peixes expostos a poluentes.

As vacuolizações hepáticas representam armazenamento de glicogênio e lipídeos e podem ocorrer quando a tomada de energia excede os requerimentos metabólicos. O fígado de peixes tende a estocar o excesso de energia em forma de glicogênio e ou lipídeo no citoplasma dos hepatócitos. Isso é comum em peixes de cultivos que são alimentados com rações calóricas e não tem muitos gastos energéticos. A predileção para acumular glicogênio ou lipídeo é espécie dependente e pode estar relacionada à dieta (Wolf et al. 2015).

Peixes doentes, estressados ou malnutridos frequentemente exibem uma redução nos estoques hepáticos de energia, diminuindo a vacuolização hepatocelular (Wolf et al. 2015). Uma resposta morfológica hepática comum em peixes expostos a agentes tóxicos é a perda de glicogênio e ou lipídeo (Ferguson 1989). Essa perda pode ocorrer como efeito direto da intoxicação, porém a exposição a agentes tóxicos pode também resultar em acúmulo de gordura ou glicogênio hepático, com a hipótese de ser resultante do decréscimo de quebra de glicogênio devido a toxicidade hepatocelular (Wolf & Wolfe 2005). Stoyanova et al.(2012) estudando carpas expostas por 96 horas a 6,6; 10 e 20mg/L de Actara 25WG demonstraram que a intensidade da coloração de reação ao ácido periódico de Schiff, em fígados, foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do inseticida, indicando um aumento na quantidade de glicogênio hepático. Em pacus sadios expostos a 75mg/L de tiametoxam em banhos terapêuticos por sete dias não foi identificada nenhuma alteração histopatológica em brânquias, fígado, rins e pele, no entanto, houve uma polarização do glicogênio hepático, indicando que esta reserva energética estava sendo utilizada(Carraschi 2014).

Vale ressaltar que nesse experimento, nas primeiras 96 horas, os animais não foram alimentados e após esse período foi feita a oferta diária de alimento. Esse fato pode refletir em uma maior vacuolização nos animais avaliados após 15 dias, independente de estarem ou não expostos ao inseticida, uma vez que não houve diferença no grau de vacuolização entre o grupo controle e o exposto.

No presente trabalho a maioria dos fígados apresentaram um grau elevado de vacuolização, independente de pertencerem a grupos expostos ou não ao inseticida. A reação ao PAS foi fracamente positiva nos animais que apresentavam um maior grau de vacuolização, o que pode estar relacionado a uma maior presença de lipídeos em relação ao glicogênio. Outra possibilidade para a quantidade de vacúolos presentes nos animais pode estar relacionada à alimentação oferecida, uma vez que ainda não existe um protocolo com dados técnicos para o cultivo de pacamã, gerando hipótese de que a dieta ofertada pode estar com elevada taxa calórica, o que deve ser posteriormente avaliado.

Em relação as congestões hepáticas encontradas, não foi observada diferença entre os grupos expostos e o controle, sendo essa alteração não considerada como indicativa de toxicidade do tiametoxam. Segundo Wolf et al. (2015), a avaliação de congestão e dilatação de sinusóides pode estar relacionada a forma como o peixe foi eutanasiado. Quanto a necrose hepática, estafoi uma alteração encontrada por outros autores em experimentos com exposição de peixes a agrotóxicos, como em tilápias do Nilo alimentadas com 1.45 g/l de deltametrina (Kan et al. 2012), *Heterobranchus bidorsalis* expostos a cipermetrina (Olufayo & Alade 2012) e *Poecilia reticulata* expostos a 250 µg/L de rotenona (Melo et al. 2015). Segundo Wolf & Wolfe (2005), a necrose é uma resposta claramente patológica do fígado de peixes relacionada às toxinas. Necrose focal pode estar isolada entre o tecido hepático normal ou infiltrado por células inflamatórias e é uma alteração que pode estar associada a várias condições tóxicas, incluindo pesticidas (Roberts 2012). O fígado geralmente demonstra os efeitos tóxicos após exposição prolongada (Melo et al.2015), o que foi observado nesse experimento, com o aumento da ocorrência de necrose nos animais expostos cronicamente ao tiametoxam.

CONCLUSÃO

O inseticida a base de tiametoxam avaliado nesse experimento causou necrose hepática nos animais expostos por 96 horas e 15 dias, com aumento do número de animais afetados após 15 dias de exposição. A CI50 foi determinada como superior a 100mg/L.

REFERÊNCIAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2011. Ecotoxicologia aquática. Toxicidade aguda: Método de ensaio com peixes. ABNT, Rio de Janeiro. 22p.
- Albinati A.C.L., Albinati, R.C.B., Soares P.C., Lira, A.D., Maslowa, T. 2014. Toxicidade aguda do tiametoxam para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, 13, Aracaju. *Anais...Aracaju*: ABRAPOA, CD-Rom. ENBRAPOA.
- Anderson J.C., Dubetz C., Palace, V.P. 2015. Neonicotinoids in the Canadian Aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment*. 505(1):409-422.
- Barbee G.C., Stout M.J. 2009. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest Manag Sci*. 65(11):1250-1256.
- Bedor C.N.G., Ramos L.O., Rêgo M.A.V., Pavão A.C., Augusto L.G.S. 2007. Avaliação e reflexão da comercialização e utilização de agrotóxicos na região do submédio do Vale do São Francisco. *Rev. Baiana Saúde Pública*. 31(1): 68-76.
- Campeche D.F.B., Balzana L., Figueiredo R.C.R., Barbalho M.R.S., Reis F.J.S., Melo J.F.B. 2011. Peixe nativo do rio São Francisco adaptado para cultivo. *Embrapa semiárido*. Documento, 244.
- Carraschi, S.P. 2014. *Ecotoxicidade, segurança clínica e eficácia de fármacos em jovens de pacu (Piaractus mesopotamicus)*. Tese doutorado em aquicultura. Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p.101.
- Carraschi S.P., Barbuio R., Ikefuti C.V., Florêncio T., Cruz C., Ranzani-Paiva M.J.T. 2014. Effectiveness of therapeutic agents in disease treatment in *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture*. 431(7):124-128.
- Carraschi S.P., Florêncio T., Garlich N., Carraschi S.P., Florencio T. 2015. Ecotoxicology of drugs used in fish disease treatment. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*. 7(3):31-36.
- Ferguson H. 1989. *Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*. Iowa State University Press, Iowa, 263p.
- Figueiredo R.A.C.R., Souza R.C., Bezerra K.S., Campeche, D.F.B., Campos R.M.L., Souza A.M., Melo J.F.B. 2014. Relação proteína:carboidrato no desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 66(5):1567-1576.
- Fulton M.H., Key P.B., Delorenzo M.E. 2014. Insecticide toxicity in fish, p.310-369. In: Tierney K.B., Farrell A.P., Brauner C.J. *Organic chemical toxicology of Fishes, USA*, ed. Elsevier, p.576.
- Helfrich L. A., Weigmann D. L., Hipkins P., Stinson E.R. 1996. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. Virginia State University, June, p.420-013. Disponível em: www.ext.pt.edu/pubs/waterquality/420-013.html. Acessado em: 02/03/2004.
- Lins J.A.P.N., Kirschnik P.G., Queiroz V.S., Cirio S.M. 2012. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient*. 8(4):469-484.
- Londres, F. 2011. *Agrotóxicos no Brasil: Um guia para ação em defesa da vida*. Rio de Janeiro, 190p.
- Luna L.G. 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. McGraw-Hill, New York. 258p.

- Maienfisch P., Angst M., Brandl F., Fischer W., Hofer D., Kayser H., Kobel W., Rindlisbacher, A., Senn R.A., Widmer H. 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid. *Pest. Manag. Sci.* 57(10):906-913.
- Rigotto R.M., Vasconcelos D.P., Rocha M.M., 2014. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Cad. Saúde Pública.* 30(7):1-3.
- Rocha, A. M. A. 2014. Desempenho e exigência de proteína na dieta de alevinos de Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), 48p. Dissertação (mestrado em Zootecnia). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, p.48.
- Santos-Filho F.M., Rezende, K.F.O., Emerenciano A.K., Moreira L.M., Vila V.B., Borges R.M., Pressinotti L.N. 2014. Avaliação de biomarcadores histológicos em peixes coletados a montante e a jusante da mancha urbana. *Atas de Saúde Ambiental.* 2(1):9-22, 2014.
- Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Triebkorn R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of aquatic ecosystem stress and recovery.* 6(1):75-86.
- Silva G.S., Albuquerque Jr. E.C., Amorim Jr. A.C., Ezequiel J.M., Silva P.T.S. 2014. Avaliação da potencial contaminação das águas superficiais e subterrâneas por agrotóxicos em áreas de produção de uva para exportação no Vale do São Francisco. Simpósio Ítalo-brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Natal, 12, anais, p.1-7. (resumo).
- Stoyanova S., Georgieva E., Velcheva I., Atanasova, P. 2012. Effects of the insecticide "actara 25 wg" on the glyconeogenesis in the liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Biosci. Biotech.* 1(3):249-254.
- Tavares D.A. 2011. Análise morfológica e imunocitoquímica do cérebro de abelhas africanizadas *Apis mellifera* após exposição à doses subletais do inseticida tiametoxam. Dissertação (mestrado em biologia celular e molecular). Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.75.
- Tenório R. A., Santos A. J. G., Lopes J. P., Nogueira E. M. S. 2006. Crescimento do niquim (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876), em diferentes condições de luminosidade e tipos de alimentos. *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* 28(4):305-309.
- Uğurlu P., Ünlü E., Satar E.I., 2015. The toxicological effects of thiamethoxam on *gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937)(*Crustacea: Amphipoda*). *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 39(2):720-726.
- Viana A.P., Frédou F.L., Montes C.S., Rocha R.M. 2013. Fish histopathology and catalase activity as biomarkers of the environmental quality of the industrial district on the amazon estuary, brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* 35(3):395-401.
- Wolf J.C., Wolfe, M. J. 2005. A brief overview of non-neoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol. Pathol.* 33(1):75-85.
- Wolf J.C., Baumgartner W.A., Blazer V.S., Camus A.C., Engelhardt J.A., Fournie J.W., Frasca J.R.S., Groman D.B., Kent L., Khoo L.H., Law J.M., Lombadiri E.D., Ruehl-Fehlert C., Segner H.E., Smith S.A., Spitsbergen J.M., Weber K., Wolfer M.J. 2015. Nonlesions, misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators, authors, reviewers, and reader. *Toxicol. Pathol.* 43(3):297-325.
- Zucker E. 1985. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. USEPA Publication, Washington, 540(9)
- Kan Y., Cengiz E.I., Ugurlu P., Yanar M. 2012. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to

Deltamethrin. *Environmental toxicology and pharmacology*. 34: 170–179.

Melo K. M., Oliveira R., Grisolia C. K., Domingues I., Pieczarka J. C., Souza Filho J., Nagamachi C. Y. 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. *Environ Sci Pollut Res*. 22: 13926–13938.

Olufayo M. O., Alade O. H. 2012. Acute toxicity and histological changes in gills, liver and kidney of catfish, *Heterobranchus bidorsalis* exposed to cypermethrin concentration. *African Journal of Agricultural Research*. 7(31): 4453-4459.

Roberts R. J. 2012. *Fish Pathology*. Wiley-Blackwell, London, 583p.

Legenda das Figuras

Fig 1. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático com diferentes graduações de vacuolização (obj. 40x). Em A, vacuolização grau 1 referente a animal do grupo controle 96 horas (HE); em B, controle 96 horas, vacuolização grau 1 demonstrando reação positiva ao PAS (seta amarela) (PAS); em C, animal exposto ao T1 por 96 horas, apresentando vacuolização grau 2 (HE), em D, animal exposto ao T1, vacuolização grau 2 demonstrando reação positiva ao PAS; em E, animal exposto ao T5 por 15 dias, apresentando vacuolização grau 3 (HE); em F, animal exposto ao T5 por 15 dias, vacuolização grau 3, demonstrando a fraca reação ao PAS (granulações). Seta amarela - área de reação positiva ao PAS. Asterisco (*) - veia central.

Fig 2. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático de pacamã expostos ao tiametoxam por 15 dias. Em A, extensa área de necrose (seta preta) com presença de hemácias (*) (HE, obj.10x). Em B, área de necrose e com presença de núcleos picnóticos (seta amarela) (HE, obj.40x).

Fig 3. Distribuição da frequência absoluta de necrose hepática em pacamãs expostos ao tiametoxam por 96 horas e 15 dias.

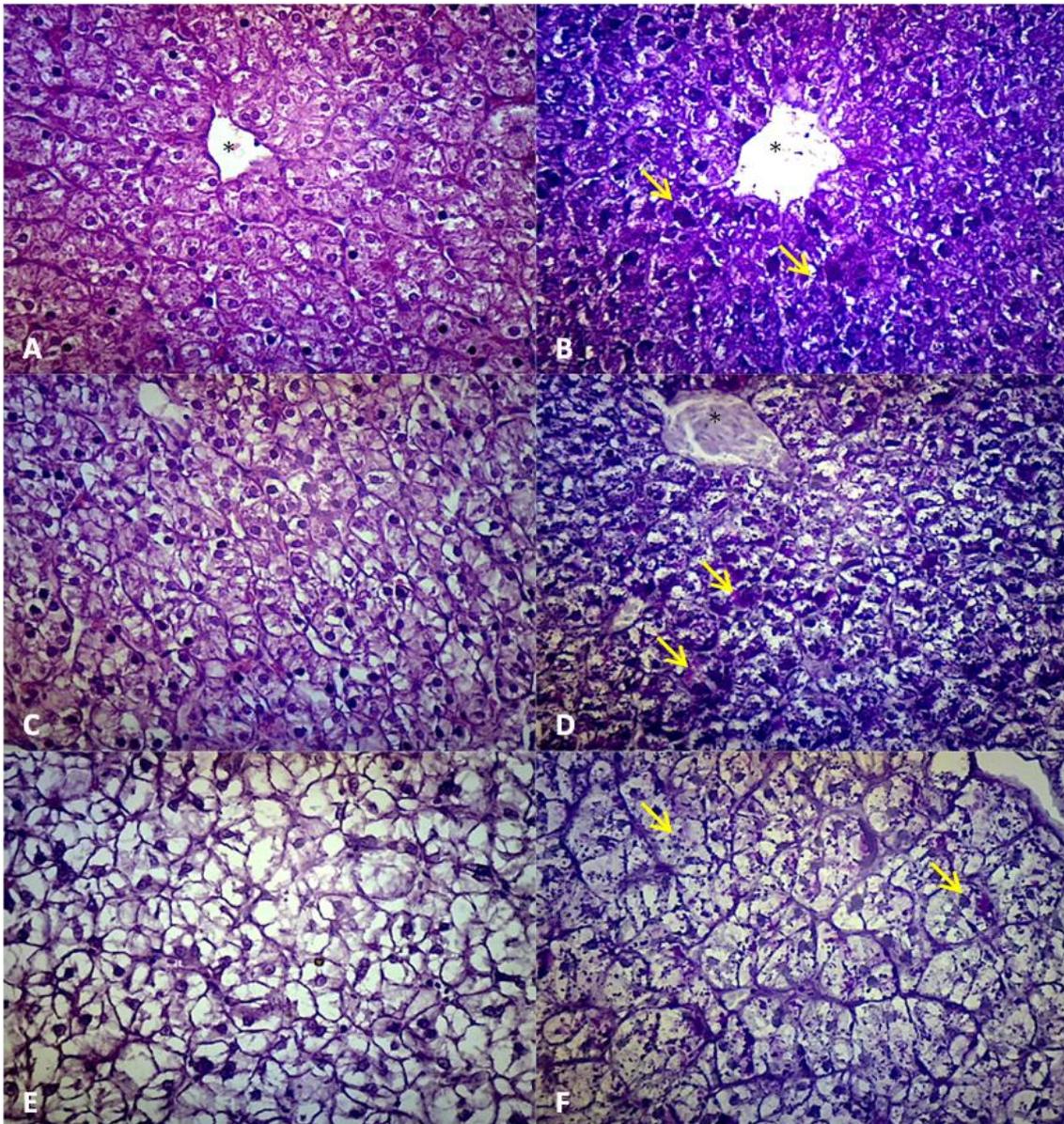


Fig. 1. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático com diferentes graduações de vacuolização (obj. 40x). Em A, vacuolização grau 1 referente a animal do grupo controle 96 horas (HE); em B, controle 96 horas, vacuolização grau 1 demonstrando reação positiva ao PAS (seta amarela) (PAS); em C, animal exposto ao T1 por 96 horas, apresentando vacuolização grau 2 (HE), em D, animal exposto ao T1, vacuolização grau 2 demonstrando reação positiva ao PAS; em E, animal exposto ao T5 por 15 dias, apresentando vacuolização grau 3 (HE); em F, animal exposto ao T5 por 15 dias, vacuolização grau 3, demonstrando a fraca reação ao PAS (granulações). Seta amarela - área de reação positiva ao PAS. Asterisco (*) - veia central.

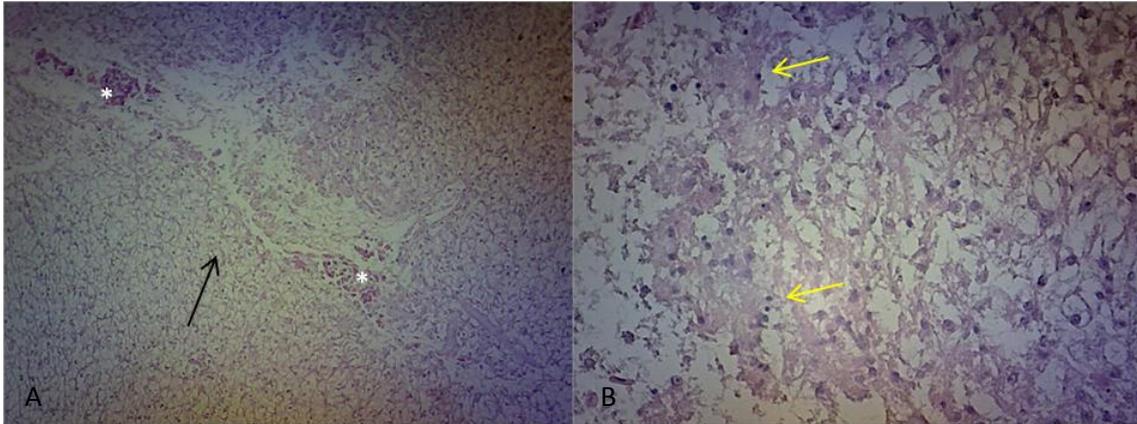


Fig. 2. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático de pacamã expostos ao tiametoxam por 15 dias. Em A, extensa área de necrose (seta preta) com presença de hemácias (*) (HE, obj.10x). Em B, área de necrose com presença de núcleos picnóticos (seta amarela) (HE, obj.40x).

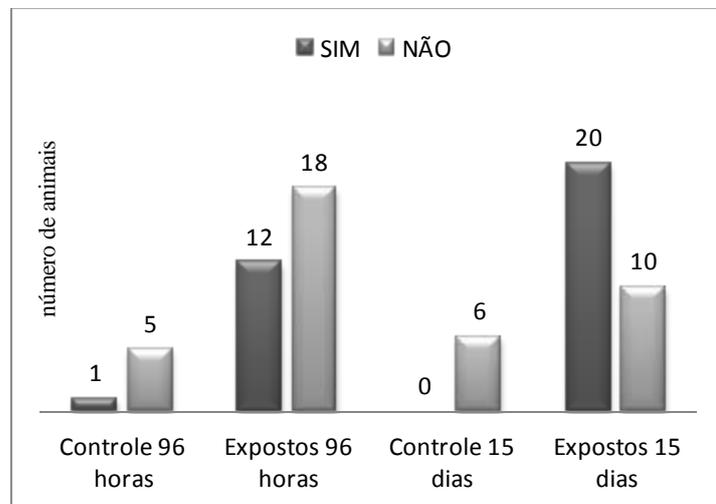


Fig. 3. Distribuição da frequência absoluta de necrose hepática em pacamãs expostos ao tiametoxam por 96 horas e 15 dias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apoiado nos resultados obtidos nesta pesquisa, constatou-se que o tiametoxam apresentou CL50 superior a 100mg/L sendo classificado como ligeiramente tóxico para as duas espécies estudadas, *Oreochromis niloticus* e *Lophiosilurus alexandri*. No entanto, a histopatologia hepática se mostrou uma excelente ferramenta para avaliação de toxicidade, uma vez que em ambas as espécies, tanto em exposições agudas quanto em exposições crônicas, observaram-se alterações significativas no fígado, como a necrose hepática. Mesmo em concentrações dez vezes menor que a CL50, como foi no experimento com a tilápia, o tiametoxam apresentou hepatotoxicidade. Dos parâmetros bioquímicos avaliados em tilápias, a proteína total e os triglicerídeos apresentaram utilidade na avaliação de toxicidade.

7. ANEXOS

ANEXO A–INSTRUÇÕES AOS AUTORES (ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA).

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (online), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia do Certificado de aprovação do projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. Esclarecemos que o referido documento deve constar como sendo a primeira página do texto em Word (não incluir no texto em pdf), além da menção, em Material e Métodos, do número do Certificado de aprovação do projeto.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

- **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
2. o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.

- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

- **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
 - **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
 - **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do Certificado de aprovação do CEUA. (verificar o Item Comitê de Ética).
 - **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
- ✓ *Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.
- ✓ *Figura.* Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
 - ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

ANEXO B – INSTRUÇÕES AOS AUTORES (PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA)



ISSN 0100-736X *versión impresa*
ISSN 1678-5150 *versión online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da

página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriadamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto).

5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas**. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.