

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

JULIO CESAR QUEIROZ

Controle químico de ninfas de libélula (Insecta, Odonata) durante a larvicultura do
Jundiá (Rhamdia quelen)

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR

2017

JULIO CESAR QUEIROZ

Controle químico de ninfas de libélula (Insecta, Odonata) durante a larvicultura do
Jundiá (*Rhamdia quelen*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Zootecnia Níveis de mestrado e doutorado, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição e produção animal

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR

2017

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Família, pelo apoio e suporte durante esta fase da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Robie Allan Bombardelli.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos, fundamental para a realização dos experimentos.

À professora Lilian Dena da UFPR/Palotina, pelo suporte com as análises físico-químicas da água nos experimentos do meu EGQ.

À professora Marta Margarete Cestari e Gustavo Souza da UFPR/Curitiba, pelas análises do ensaio cometa, fundamentais para esta pesquisa.

À professora Helena Cristina da Silva de Assis da UFPR/Curitiba, pelas análises de atividade da Acetilcolinesterase, fundamentais para o artigo da dissertação de mestrado.

Ao Inpaa (Instituto de pesquisa em aquicultura ambiental) e ao Latraac (laboratório de tecnologia da reprodução de animais aquáticos cultiváveis) pelo suporte a todos os meus experimentos.

"Eu sou um intelectual que não tem medo de ser amoroso. Eu amo as gentes e amo o mundo."

Paulo Freire

QUEIROZ, Julio Cesar. **Controle químico de ninfas de libélula (Insecta, Odonata) durante a larvicultura do Jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2017. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Zootecnia Níveis de Mestrado e Doutorado, do Centro de Ciências Agrárias. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, PR. 2017. 63 p.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a eficiência dos agroquímicos/contaminantes Paration metílico, Cipermetrina, Azadiractina e Extrato pirolenhoso no controle de náíades de libélula (*P. flavescens*) durante a larvicultura do jundiá (*Rhamdia quelen*), assim como, averiguar a predação e os possíveis danos genotóxicos, histopatológicos e neurotóxicos que podem causar nas larvas. Foram realizados três ensaios. No primeiro foram testadas diferentes doses de cada produto para determinar as doses letais e letárgicas. Para isso, foram utilizados 270 náíades para cada produto testado e 9 para o controle, totalizando 1089 animais. As náíades foram distribuídas em aquários com volume total de 1L em triplicatas. Para determinar as doses, iniciou com uma superdose ($1000 \mu\text{L}^{-1}$) e em seguida foi observado o tempo em que as náíades levam até o óbito. As doses foram diminuídas gradativamente em $100 \mu\text{L}$ e abaixo dessa dose, a diminuição foi em intervalos de $5 \mu\text{L}$. No segundo ensaio foram utilizadas as doses determinadas no ensaio I. Testes de predação em exposição aos produtos foram realizados em aquários com volume total de 1L, dispostos em triplicatas para cada dose teste acrescido do controle. Em cada aquário foi disposta uma ninfa de libélula e 10 larvas de jundiá, observando a quantidade de larvas consumidas no tempo letal de exposição ao produto, conforme determinado no ensaio anterior. O delineamento foi inteiramente casualizado com nove tratamentos e três repetições, totalizando 27 unidades experimentais. Os tratamentos foram constituídos pelas doses de cada produto. No terceiro ensaio foi realizada a larvicultura do jundiá por 30 dias com exposição aos produtos. Foram utilizadas 4000 larvas de jundiá com 120 horas pós-eclosão (HPE), distribuídas aleatoriamente em 20 aquários com volume total de 70L. As doses foram aplicadas em intervalos de 7 dias, simulando o ciclo de postura dos ovos e eclosão das ninfas de libélula. A substituição de água foi feita diariamente em 5%, juntamente com a limpeza dos aquários. O delineamento desse ensaio foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando 20 unidades experimentais. Foram deliberadas oito doses letais e letárgicas: $5 \mu\text{L/L}$ para o Paration metílico, $10 \mu\text{L/L}$ para a Cipermetrina, 30, 25 e $20 \mu\text{L/L}$ para a Azadiractina e 20, 15 e $10 \mu\text{L/L}$ para o Extrato pirolenhoso. Nos testes de predação, o tratamento contendo Azadiractina nas doses de 30, 25 e $20 \mu\text{L/L}$ sugere sobrevivência de até 43% das larvas, o Extrato pirolenhoso 25,6%, a Cipermetrina e o Paration metílico 87 e 73%, respectivamente. No terceiro ensaio após a larvicultura, não foram evidenciados qualquer índice de possíveis danos histopatológicos em fígado e brânquias. O ensaio cometa sugere que a Cipermetrina e o Paration metílico causam danos ao DNA. A enzima acetilcolinesterase foi inibida somente pelo Paration metílico. A utilização do óleo de nim pode ser uma alternativa natural a utilização de agroquímicos em tanques de cultivo na larvicultura do jundiá cinza (*Rhamdia quelen*), tendo em vista que não apresenta toxicidade aos animais e a predação é reduzida significativamente.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. DNA. Genotoxicidade. Histopatologia. Predação.

QUEIROZ, Julio Cesar. **Controle químico de ninfas de libélula (Insecta, Odonata) durante a larvicultura do Jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2017. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Zootecnia Níveis de Mestrado e Doutorado, do Centro de Ciências Agrárias. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, PR. 2017. 63 p.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the efficiency of the agrochemicals/contaminants Methyl paration, Cypermethrin, Azadirachtin and Pyroligneous extract in the control of dragonfly naiads (*P. flavescens*) during the larviculture of the catfish (*Rhamdia quelen*) as well as to investigate the predation and the possible genotoxic, histopathological and neurotoxic damages that can cause in the larvae. Three trials were performed. In the first, different doses of each product were tested to determine lethal and lethargic doses. For this, 270 naiads were used for each product tested and 9 for control, totaling 1089 animals. The naiads were distributed in aquariums with a total volume of 1L in triplicates. To determine the doses, it started with an overdose (1000 μl / L-1) and then observed the time in which the naiads lead to death. The doses were gradually decreased in 100 μl and below that dose the decrease was in 5 μl intervals. In the second trial, the doses determined in test I were used. Predation tests on product exposure were performed in aquaria with a total volume of 1L, arranged in triplicates for each test dose plus control. In each aquarium a nymph of dragonfly and 10 catfish larvae were arranged, observing the amount of larvae consumed in the lethal time of exposure to the product, as determined in the previous test. The design was completely randomized with nine treatments and three replicates, totaling 27 experimental units. The treatments were constituted by the doses of each product. In the third trial were carried out for 30 days the catfish larviculture with exposure to the products. 4000 catfish larvae were used with 120 hours post-hatching (HPE), randomly distributed in 20 tanks with a total volume of 70 l. The doses were applied at intervals of 7 days, simulating the egg laying cycle and hatching of the dragonfly nymphs. The water replacement was done daily at 5% along with cleaning the aquariums. The experimental design was completely randomized with five treatments and four replicates, totaling 20 experimental units. Eight lethal and lethargic doses were planned: 5 μl / L for Methyl paration, 10 μl / L for Cypermethrin, 30, 25 and 20 μl / L for Azadirachtin and 20, 15 and 10 μl / L for the Pyroligneous extract. In the predation tests, the treatment containing Azadirachtin at the doses of 30, 25 and 20 μl / L suggests survival of up to 43% of the larvae, Pyroligneous extract 25.6%, Cypermethrin and Methyl paration 87 and 73%, respectively. In the third trial after the larviculture were not evidenced any index of histopathological damage in liver and gills. The comet assay suggests that Cypermethrin and Methyl paration cause damage to DNA. The enzyme acetylcholinesterase was inhibited only by Methyl paration. The use of nim oil may be a natural alternative to use of agrochemicals in cultivation tanks in catfish larviculture (*Rhamdia quelen*), considering that it does not present toxicity to animals and predation is significantly reduced.

Key words: Acetylcholinesterase. DNA. Genotoxicity. Histopathology. Predation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da molécula de Paration metílico	19
Figura 2. Fórmula estrutural da Cipermetrina	21
Figura 3. Flores, folhas e frutos do Nim indiano	22
Figura 4. Fórmula estrutural da molécula de Azadiractina.....	22
Figura 5. Exemplar de <i>P. flavescens</i>	27
Figura 6. Jundiá cinza (<i>Rhamdia quelen</i>).....	28
Figura 7. Escore de danos ao DNA descrito por Collins (2004). Ensaio cometa em eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i>	47
Figura 8. Tecido branquial de <i>Rhamdia quelen</i> expostos a diferentes agroquímicos/contaminantes ao longo de 30 dias de criação.....	52
Figura 9. Tecido hepático de <i>Rhamdia quelen</i> expostos a diferentes agroquímicos/contaminantes ao longo de 30 dias de criação	53
Figura 10 Escore de danos evidenciados no DNA em eritrócitos de <i>Rhamdia quelen</i> expostos a diferentes agroquímicos e contaminantes ao longo de 30 dias de criação.....	53
Figura 11. Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) no músculo de <i>Rhamdia quelen</i> expostos a diferentes agroquímicos/contaminantes ao longo de 30 dias de criação.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Volumes dos produtos utilizados e diferentes concentrações do princípio ativo.....	43
Tabela 2. Doses utilizadas nos testes de predação em diferentes concentrações do princípio ativo.....	44
Tabela 3. Dosagens de diferentes produtos para o controle de náíades, aplicados semanalmente na água durante a larvicultura do jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	45
Tabela 4. Tempo necessário para indução da mortalidade em náíades de libélulas (<i>P. flavescens</i>) expostas a diferentes concentrações de produtos agroquímicos/contaminantes.....	50
Tabela 5. Tempo e consumo de larvas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) por náíades de libélula nos testes de predação.....	51
Tabela 6. Mortalidade das larvas de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) durante a larvicultura de 30 dias com exposição aos contaminantes.....	51

SUMÁRIO

Capítulo I – Revisão de literatura	12
1. O avanço e a importância da piscicultura de peixes nativos	13
2. Limitantes na larvicultura de peixes nativos	14
3. Agroquímicos em ambientes aquáticos	16
4. Organofosforados	17
5. Piretróides	19
6. Azadiractina	21
7. Extrato Pirolenhoso	23
8. Genotoxicidade	23
8.1. Ensaio cometa	24
9. Neurotoxicidade de agroquímicos	24
10. Indicadores histopatológicos de toxicidade	25
11. Libélulas (Insecta, Odonata)	26
12. Jundiá cinza (<i>Rhamdia quelen</i>)	27
13. Referências	29
Capítulo II - Controle químico de ninfas de libélula (Insecta, Odonata) durante a larvicultura do Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	38
1. Introdução	39
2. Objetivos	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3. Material e métodos	41
3.1 Local, duração do experimento e origem dos animais experimentais	41
3.2 Produtos utilizados no experimento	42
3.3 Experimento I - Determinação das doses letais e para indução à letargia ...	42
3.4 Experimento II - Testes de predação	43
3.5 Experimento III - larvicultura do jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) com exposição a contaminantes	45
3.5.1 Análises histológicas	46

3.5.2	Eletroforese em gel de célula única (Ensaio cometa)	46
3.5.3	Atividade da enzima Acetilcolinesterase	48
3.6	Análises estatísticas	48
4.	Resultados	49
4.1	Experimento I - Determinação das doses letais e para indução à letargia ..	49
4.2	Experimento II – Testes de predação	50
4.3	Experimento III - larvicultura do jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) com exposição a contaminantes	51
4.3.1	Mortalidade	51
4.3.2	Análises histológicas	52
4.3.3	Eletroforese em gel de célula única (Ensaio cometa).....	53
4.3.4	Atividade da Acetilcolinesterase	53
5.	Discussão	54
6.	Conclusão	58
7.	Referências	59

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

1. O AVANÇO E IMPORTÂNCIA DA PISCICULTURA DE PEIXES NATIVOS

A busca por produtos da indústria pesqueira teve um avanço nos últimos anos. Isso se deve ao aumento populacional que busca uma alimentação cada vez mais saudável (SIDONIO et al., 2012). Frente a este mercado consumidor, a produção aquícola é a alternativa mais indicada para que os números cresçam ainda mais ao longo dos anos, tendo em vista que a pesca encontra-se com uma produção estável desde a década de 1990 (FAO, 2016a).

Houve um crescimento da produção de pescado no mundo, a uma taxa média anual de 3,2% nos últimos 50 anos, sendo essa taxa maior que o crescimento populacional no mesmo período em 1,6% (BRABO et al., 2016). Em comparação, o consumo de pescado por pessoa na década de 1960 foi de 9,9 kg por ano, e em 2012 estes números passaram para 19,2 kg (FAO, 2016b). Este aumento acompanha o crescimento da renda *per capita*, o acesso da população às informações nutricionais, o empenho da indústria gastronômica e principalmente, pelo desenvolvimento tecnológico da aquicultura (FAO, 2016b).

Os produtos da indústria do pescado possuem alto valor nutricional, são fontes de proteínas, ácidos graxos insaturados e vitaminas, além de apresentarem baixo colesterol, oferecendo uma opção mais saudável em relação a outros animais (GONÇALVES et al., 2011). No ano de 2012, a produção mundial de pescado foi de aproximadamente 158 milhões de toneladas, sendo 91,3 milhões de toneladas vindas da pesca e 66,6 milhões da aquicultura. Sendo desse total 136,2 milhões destinados ao consumo humano e 21,7 milhões de toneladas transformadas em óleo e farinha de peixe, utilizados na nutrição animal (FAO, 2016a; FAO, 2016b).

Essas informações enfatizam a essencialidade do pescado para o comércio internacional. No geral, a produção mundial da pesca e aquicultura estabilizou em cerca de 90 milhões de toneladas nas últimas duas décadas e a estimativa é que esse nível se mantenha (FAO, 2016b). Assim, a tendência é que a aquicultura seja a atividade responsável por atender a maior parte da demanda global por produtos oriundos da indústria do pescado nos próximos anos, sendo essa atividade, a que vem crescendo

mais rapidamente no setor de produção de alimentos de origem animal, com média de 6,2% entre 2000 e 2012 (BRABO et al., 2016).

A maior concentração de peixes de água doce do mundo está no Brasil. São mais de 2.500 espécies nativas, sendo que muitas ainda não foram descritas (BUCKUP et al., 2007). Entre essas espécies, pelo menos 40 possuem potencial para a aquicultura. Isso se deve ao Brasil possuir a maior reserva de água doce do planeta, uma extensão com mais de 8 mil km³, sendo o aproveitamento desses recursos para a produção aquícola muito menor que o seu potencial (SIDONIO et al., 2012). Apesar de o Brasil ser um país com grande potencial de produção aquícola, o consumo de pescado por pessoa foi de apenas 11,1 kg em 2011, valor inferior à média mundial e ao consumo de aves, bovinos e suínos no país (BRABO et al., 2016).

No ano de 2015, a produção de pescado nacional não conseguiu atender a demanda comercial, sendo necessária a importação de países como a China, Argentina e Chile, de 349,5 mil toneladas (BRASIL, 2013a). Apesar do aumento significativo da pesca ativa no Brasil nos últimos anos, a expectativa de crescimento da produção é maior na aquicultura, visto que o país conta com características favoráveis ao cultivo, citadas anteriormente, e também conta com diversas espécies de potencial zootécnico e comercial (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013b).

2. LIMITANTES NA LARVICULTURA DE PEIXES NATIVOS

A piscicultura é o ramo mais desenvolvido da aquicultura brasileira, tendo como principais fatores limitantes para o seu desenvolvimento: dificuldade de regularização ambiental; elevado custo de produção; assistência técnica insuficiente; baixa qualificação dos produtores; poucas opções de linhas de crédito; baixos preços pagos ao piscicultor; dificuldade de acesso à tecnologia; limitações do mercado regional; mortalidade de peixes por enfermidades e dificuldades na larvicultura (KUBITZA, 2012).

Nesse último caso, destaca-se o preparo dos viveiros como o fator determinante para o sucesso da larvicultura. O preparo e a manutenção dos viveiros começam desde a qualidade da água em que as larvas serão alojadas até o controle de predadores, como insetos aquáticos e aves.

Diversas espécies de peixes nativos como o jundiá cinza (*Rhamdia quelen*) e o mandi pintado (*Pimelodus britskii*), apresentam comportamento canibal na fase larval, sendo a qualidade da água dos viveiros um fator determinante para o desenvolvimento do microcosmo, ou seja, para o crescimento dos plânctons necessários para a alimentação inicial em ambientes de cativeiro. A nutrição exógena é de fundamental importância para a diminuição do canibalismo, devendo o arraçoamento ser parcelado, para que não falte alimento para as larvas e para facilitar sua adaptação às dietas comerciais (SCORVO FILHO et al., 2008).

Além do preparo dos viveiros, manutenção da qualidade da água e redução do canibalismo existem outros fatores limitantes, como a existência de insetos aquáticos predadores que podem predar em larga escala (WOYNAROVICH & HORVATH, 1983), sendo um grande problema em criação semi-intensiva.

Para o controle de predadores do meio externo, como as aves ou lagartos, o método comumente adotado por produtores são telas de malha sobrepostas em cada extremidade dos viveiros, dificultando o acesso dos animais a água.

Assim como no ambiente externo, dentro dos viveiros forma-se um microcosmo, ou seja, um ecossistema completo e isolado, onde existem diversos seres vivos que competem por oxigênio e alimento. Como em todo o ecossistema, o ambiente interno dos viveiros de piscicultura é formado por teias e cadeias alimentares que são compostas por fitoplânctons, zooplânctons, larvas de peixes e insetos aquáticos (ODUM, 1971).

Em meio aos insetos aquáticos, a forma jovem das libélulas que popularmente são conhecidas pelo nome da sua ordem, as odonatas, são as principais predadoras de larvas e alevinos de peixes, e essa predação pode causar desde uma diminuição até a perda total da produção (KUBITZA, 2004).

Os principais métodos de controle da predação são baseados em ações mecânicas, químicas e biológicas (DELGADO et al., 1995). Tais métodos foram desenvolvidos todos com o mesmo objetivo, diminuir ou apenas controlar os níveis de predação de alevinos na fase jovem das libélulas.

No primeiro caso, o controle da vegetação existente nas extremidades dos viveiros de piscicultura ou até mesmo sobre a água auxilia no controle populacional da odonata, pois algumas espécies dessa ordem realizam postura indireta dos ovos, depositando-os na vegetação e dependendo de fatores ambientais externos, como o vento e a chuva para entrarem em contato com a água (TAVE et al., 1990). Já nas espécies de postura direta,

a utilização de redes ou malhas sobre a superfície da água diminui significativamente a ocorrência da fase jovem da odonata nos tanques, pois dificultam o acesso da libélula adulta à água.

Segundo DELGADO et al. (1995), esses métodos de controle diminuem a presença de náíades de 80 larvas por m² para 04 larvas por m², reduzindo assim os prejuízos causados pelas mesmas. Entretanto, segundo testes de predação realizados por TAVE (1990), indicam que esse número ainda é elevado e pode causar prejuízos significativos ao produtor.

Os autores MENEZES & YANCEY (1998) recomendam despejar no tanque 50 litros de óleo queimado por hectare de lâmina d'água até se verificar a não ocorrência de mais libélulas na fase jovem na água. Entretanto, não existem produtos ou protocolos específicos para o controle de insetos na piscicultura, e muitos produtores optam por utilizar inseticidas agroquímicos para combater a população de náíades.

A utilização de produtos agroquímicos no controle de insetos aquáticos possivelmente trará consequências graves, como o risco de intoxicação nos peixes ou resíduos desses produtos na água que em sistemas de circulação acabam nos rios, ou até mesmo, no próprio peixe podendo refletir na saúde humana que é consumidora (ZANIBONI et al.; 2000).

Ainda, a utilização de produtos químicos com o objetivo de controlar as náíades, ocasiona a morte de outros insetos presentes na água, interferindo na cadeia alimentar e prejudicando o ecossistema aquático (MATAQUEIRO, 2002).

3. AGROQUÍMICOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Os agroquímicos são altamente tóxicos e a grande maioria não se degrada no meio, podendo causar interferência na cadeia alimentar, resultando em danos aos animais e ao homem (MONTANHA et al., 2012). A cada ano, grandes áreas de terra são destinadas ao uso agropecuário e também urbano, esse crescimento tem como consequência a liberação de dejetos industriais nas águas e a emissão de partículas poluentes na atmosfera representando ameaças crescentes para a ictiofauna (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

Pesticidas utilizados em agriculturas, geralmente escoam para sistemas aquáticos desencadeando uma série de alterações no ambiente aquático e nos organismos que o

habitam (SANTIAGO-MOREIRA, 2013). Os impactos da contaminação por agrotóxicos em peixes variam de acordo com os tipos de substâncias empregadas, esses pesticidas atuam sobre o sistema nervoso de vertebrados exercendo um efeito significativo sobre os canais de sódio e interagem com os receptores GABA nos filamentos nervosos (MONTANHA et al., 2012).

Os peixes são animais sensíveis aos agentes químicos e dentre outras substâncias presentes na água. São excelentes animais para estudos de impacto toxicológico e têm sido amplamente utilizados nesse propósito (MONTANHA et al., 2012). Os organismos aquáticos estão em constante contato com substâncias estranhas ao seu organismo, substâncias estas denominadas xenobióticos (PATCHINEELAM et al., 2011).

Estudos toxicológicos de diversas substâncias fazem-se necessários já que, anualmente, são lançadas no mercado mais de mil novas substâncias químicas sintéticas sendo, a maioria, sem nenhuma avaliação adequada sob o ponto de vista da sua interação nos ecossistemas (BERNARDI et al., 2008). Atualmente, com a interferência do homem na natureza, a poluição e a contaminação do meio ambiente vêm aumentando devido a crescente carga de efluentes lançados no ar, na água e nos solos (JOBBLING, 1995). O ecossistema aquático é considerado o mais suscetível à poluição e contaminação (BERTOLETTI, 1990).

Existe uma enorme quantidade de poluentes que afetam o ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes, a compreensão detalhada dos efeitos desses diferentes tipos de efluentes nos corpos d'água receptores é essencial para o controle da poluição (MARTINEZ & CÓLUS, 2002). Segundo Tavares-Dias et al. (2001), inseticidas podem causar alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, as quais podem conduzir para distúrbios metabólicos, disfunções enzimáticas e disfunção nos organismos de peixes.

4. ORGANOFOSFORADOS

São compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico e seus homólogos (ácido fosfórico, tiofosfórico, ditiofosfórico e fosfônico) (BRACCO et al., 1997). Os compostos organofosforados (OF) são os inseticidas mais amplamente utilizados no mundo e os que mais causam intoxicações e grande número de mortes, com mais de 35.000 formulações diferentes em uso nos últimos 40 anos (ALMEIDA, 2010).

Mais de 50.000 compostos OF são conhecidos pelo homem e pouco mais de 40 são utilizados como praguicidas. O primeiro OF sintetizado foi o tetraetilpirofosfato (TEEP) em 1854 (CALDAS et al., 2000). A partir de 1932 começou-se a investigar esses agentes, inicialmente como praguicidas e mais tarde para uso como agentes de guerra.

Dentre os inseticidas organofosforados, destaca-se o Paration metílico (Figura 1), comercialmente conhecido no Brasil como Folidol 600[®] (Bayer) e Folisuper 600 BR[®] (Agripec). O Paration metílico é classificado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA como um pesticida de uso restrito, pertencente à classe toxicológica I, dos compostos extremamente tóxicos, podendo ser utilizado somente por aplicadores autorizados.

O Paration metílico é utilizado para o controle de uma grande variedade de insetos em várias culturas, como o algodão, o milho, a soja, a cana-de-açúcar e os cítricos. Segundo os fabricantes é o único produto recomendado para o controle do inseto da “broca” sendo, por isso, extensivamente usado na agricultura brasileira (MONTEIRO et al., 2009).

Na piscicultura, em tanques de produção e na preparação de viveiros de recepção de larvas e alevinos, Paration metílico é comumente aplicado para controlar larvas de insetos da ordem odonata, predadoras de peixes. Desse modo, os peixes podem estar constantemente sujeitos a exposição ao produto, seja por contaminação acidental ou em condições de tratamento em sistemas de cultivo de peixes, sendo de grande importância o estudo dos seus efeitos tóxicos.

A toxicidade do produto resulta primariamente na sua capacidade de inibir colinesterases, além dos efeitos próprios do Paration metílico, durante a sua biotransformação, onde é formado o paraxon, um metabólito que aumenta e prolonga seus efeitos tóxicos (MONTEIRO et al., 2009). O autor ainda ressalta que em peixes, a exposição a altas doses de Paration metílico, resulta em movimentos não coordenados, perda de mobilidade e de equilíbrio e alterações degenerativas no fígado, nos rins e no epitélio branquial.

A ampla utilização desse produto, o desconhecimento dos riscos da sua utilização, o consequente desrespeito às normas básicas de segurança são causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental observados no Brasil (MONTEIRO et al., 2009).

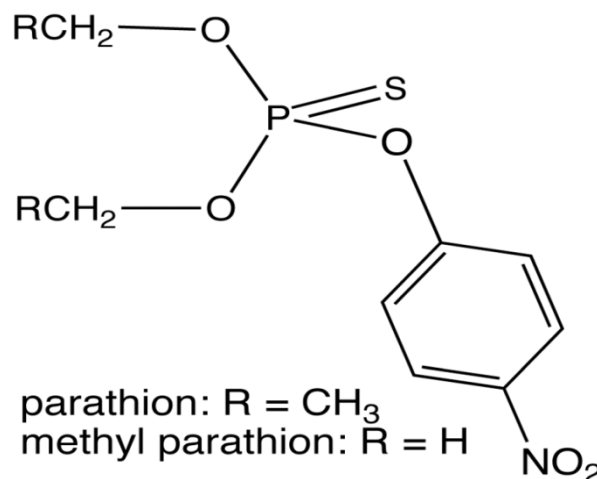


FIGURA 1. Fórmula estrutural da molécula de Paration metílico. Fonte: ANVISA (2004).

5. PIRETROIDES

Os piretróides, assim como os organofosforados são muito utilizados na agricultura (SANTOS et al., 2007). Esses compostos apresentam amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em baixa dose, baixo poder residual no ambiente e é praticamente atóxico para mamíferos, quando comparados a outros inseticidas (PIMPÃO, 2007; SANTOS et al., 2007). No entanto, apesar das vantagens apresentadas pelos piretróides em relação a outros inseticidas, os mesmos cuidados devem ser tomados para sua utilização, já que podem exercer nos vertebrados efeitos neurotóxicos e cardiotoxicos (SANTOS et al., 2007).

O piretro é um inseticida instável na luz e no ar, o que limita a sua efetividade na proteção de lavouras e no controle de insetos (PIMPÃO, 2007, SANTOS et al., 2007). Os piretroides agem nos insetos com rapidez causando paralisia imediata e mortalidade, efeito de choque denominado *knockdown* (SANTOS et al., 2007). São amplamente aceitos para o controle de insetos no mundo todo e usados no campo, nos domicílios para controle de pestes e contra piolhos humanos e veterinários (SELVI et al., 2008). Têm múltiplas funções de uso na agricultura, na medicina veterinária e na saúde pública, principalmente para controle de vetores (PIMPÃO, 2007).

Ensaios laboratoriais demonstraram que os piretróides são muito tóxicos para peixes, abelhas e alguns artrópodes aquáticos, tais como lagostas e camarões (SANTOS et al., 2007). Apesar de não ser persistente no ambiente, peixes são sensíveis aos efeitos neurotóxicos desses pesticidas (SINGH, 2008). A toxicidade verificada para mamíferos é baixa, porém estudos toxicológicos recentes com 243 pesticidas mostraram que os

piretróides estão entre os pesticidas mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como peixes e crustáceos (PIMPÃO, 2007).

Os peixes fazem íntimo contato com a água do ambiente, através das brânquias e devido a sua lipofilicidade. Piretróides têm uma alta taxa de absorção por esse órgão, o qual é um fator que contribui para a sensibilidade dos peixes a exposições aquáticas (VELISEK et al., 2007). BORGES, (2007) afirma que os piretróides são altamente tóxicos para as brânquias, causando sérias alterações epiteliais, o qual danifica as trocas gasosas e podem também causar alterações profundas como: lesões estruturais e morte das células das brânquias.

As lesões têm sido detectadas histologicamente após exposições de peixes, tanto em laboratório quanto em campo, a uma série de compostos, incluindo metais pesados, pesticidas, organoestênicos, solventes orgânicos, xenobióticos orgânicos e surfactantes. Algumas lesões comuns no epitélio da brânquia foram levantadas como: necroses, hiperplasias, hipertrofias e rupturas (BOLS et al., 2001). Esses compostos são tóxicos também para o fígado, rins, cérebro e músculos dos peixes (BORGES, 2007).

A Cipermetrina (α -ciano-3-fenoxibenzil-2,2-dimetil-cis,trans-3(2,2-diclorovinil ciclopropano caboxilato) (SINGH, 2008) (Figura 2), $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$, de peso molecular 416.30 é um piretroide sintético que vem ganhando popularidade desde 1970 (JAENSSON et al., 2007). É categorizada como um pesticida de uso restrito pela *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) devido a sua alta toxicidade aos peixes (SAHA, 2009) e pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), os produtos que contém Cipermetrina são classificados como classe de toxicidade química II (toxicidade moderada) ou III (altamente tóxico), dependendo da formulação (POLAT et al., 2002). Seu uso tem substituído os inseticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos nas duas últimas décadas (BORGES, 2007).

Mesmo a Cipermetrina sendo amplamente utilizada, poucas informações se têm a respeito dos efeitos desses inseticidas piretróides. Vale ressaltar que a Cipermetrina, assim como os piretróides em geral, é praticamente não tóxica para mamíferos e pássaros, mas é altamente tóxica para peixes e invertebrados aquáticos. A justificativa é devido à metabolização e eliminação desses compostos serem mais lentos nos peixes (YILMAZ et al., 2004; BEGUM, 2005). Entretanto, estudos enfatizando os danos genotóxicos em peixes são escassos, principalmente quando comparados à utilização direta dessas substâncias em meios aquáticos.

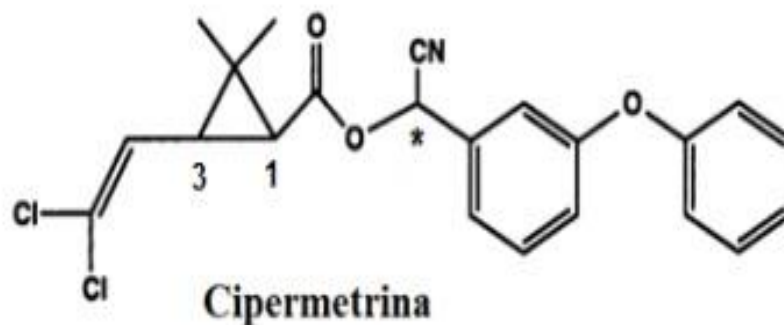


FIGURA 2. Fórmula estrutural da Cipermetrina. Fonte: ANVISA (2004).

6. AZADIRACTINA

É um tetranortriterpenoide (terpeno) e foi isolado a partir das sementes da *Azadirachta indica* por Butterworth e Morgan em 1968, e a sua completa determinação estrutural foi concluída em torno de 17 anos mais tarde (MORDUE, BLACKWELL, 1993). Devido à complexidade dessa molécula, ainda não foi possível sintetizá-la, o que impede a sua produção como pesticida sintético, sendo a sua utilização como produto natural a única opção (MORDUE, MORGAN, NISBET, 2010).

Tomazelli Jr. et al. (2011) testaram o efeito de extratos etanólicos dos frutos maduros de *M. azedarach* (que contém a substância) (Figura 3) em ninfas de náíades pertencentes às famílias Aeshnidae e Libellulidae. No tratamento com o extrato foi observada a redução na predação dos alevinos e a lentidão nos movimentos das ninfas em relação ao tratamento sem exposição, possivelmente devido ao efeito tóxico provocado pelo contato com a substância.

O Nim *Azadirachta*, planta de origem indiana, é uma fonte de inseticidas orgânicos naturais. Suas sementes são a principal fonte do inseticida natural, óleo de nim ou óleo de nim, que é obtido em prensa mecânica e extratos preparados por maceração em solventes orgânicos (SANTIAGO-MOREIRA, 2013).

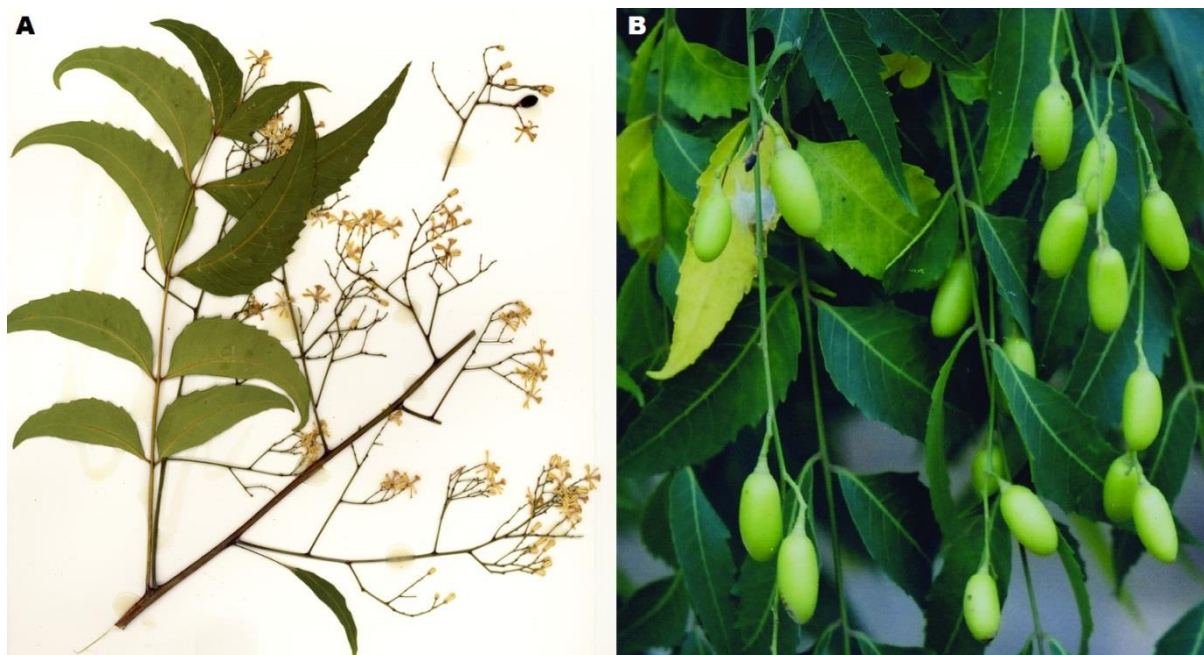


FIGURA 3. A) Excicata da árvore do Nim indiano, ver estrutura do caule, folhas e flores. B) Frutos do Nim indiano. Fonte: BISWAS et al. (2002).

Devido à sua relativa seletividade aos insetos considerados pragas agrícolas, seus produtos vêm sendo recomendados por diversos programas de manejo integrado de controle de pragas ao redor do mundo. Sementes de nim contêm numerosos metabólitos secundários, sendo o limonoide azadiractina (Figura 4) o principal dentre outros análogos (FORIM, 2010; ISMAN, 2006).

Existem dados na literatura que indicam a presença de mais de 300 compostos químicos isolados das diferentes partes da planta de Neen, a *Azadirachta indica* (GOVINDACHARI, 1992). Contudo, pesquisas com esse princípio ativo enfatizando a toxicidade em organismos aquáticos, especificamente em peixes são escassas, sendo necessárias para que essa substância natural possa ser empregada no controle de pragas aquáticas.

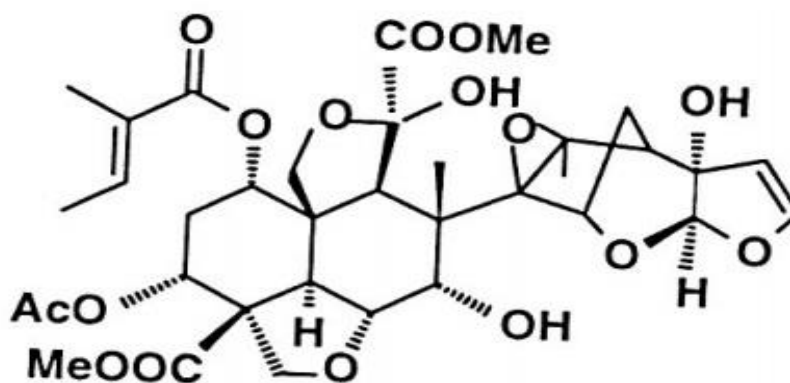


Figura 4. Fórmula estrutural da molécula de Azadiractina. Fonte: BISWAS et al. (2002).

7. EXTRATO PIROLENHOSO

Mundialmente, a produção de carvão vegetal é uma técnica bastante antiga, porém, durante o processamento, há uma sobra de pedaços pequenos, que não tem destinação comercial, sendo, portanto, um resíduo nas carvoarias. O carvão vegetal apresenta uma estrutura bastante porosa e, misturado a outros materiais como fibra de coco, casca de arroz carbonizada e casca de pinus aumentam a porosidade, a capacidade de retenção de água, facilitando a proliferação de microrganismos benéficos (ZANETTI et al., 2004).

Durante o processo de carbonização da madeira ou bambu para a produção do carvão é obtido um líquido da condensação da fumaça, denominado Extrato pirolenhoso. Esse extrato é constituído de 0,8 a 0,9 dm³ dm⁻³ de água e contém cerca de 200 componentes químicos diferentes, predominando quantitativamente o ácido acético, o metanol, a acetona e os fenóis (ZANETTI et al., 2004).

O Extrato pirolenhoso é desprezado na produção do carvão e liberado no meio ambiente, causando poluição com gases tóxicos, como o alcatrão (SILVA et al., 2006). Apesar disso, é indicado como promotor de diversos benefícios em atividade agrícola, como agente fertilizante, auxiliando na absorção de nutrientes e também, é indicado à adição de extratos vegetais (MIYSAKA et al., 1999).

Estudos do seu efeito isolado como repelente de insetos, bem como, o seu efeito em organismos aquáticos são escassos, sendo necessárias pesquisas sobre esse aspecto, assim como o impacto causado nos ecossistemas.

8. GENOTOXICIDADE

A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas, ou ainda, que essas mutações possam ser transmitidas às futuras gerações (DA SILVA et al., 2003).

As alterações estruturais nos cromossomos (clastogenicidade) ou nas sequências de pares de bases do DNA (mutagenicidade) pela exposição a agentes tóxicos podem ser referidas como genotoxicidade (AL-SABTI & METCALFE, 1995). O impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula pode ser

investigado em muitos organismos sob diferentes condições (McCARTHY & SHUGART, 1990).

Dentre os principais testes, podemos citar os de avaliação da frequência de aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, formação de adutos de DNA, ensaio cometa (que avalia quebras no DNA) e medição da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares (BOMBAIL et al., 2001). Devido às implicações ecológicas diretas associadas com genotoxicidade, a detecção e a quantificação de danos genéticos são de grande interesse em estudos ambientais (NACCI et al., 1996).

8.1 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa também conhecido como SCGE (*Single-Cell Gel Electrophoresis*), investiga danos no DNA ao nível celular individual através da medição da migração em gel do DNA de células depois de uma corrida eletroforética (SINGH et al., 1988). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL et al., 2001).

Consiste num método versátil e relativamente barato para a avaliação da genotoxicidade. Pode ser utilizado praticamente em qualquer tipo de célula nucleada e de qualquer espécie. O comprimento da cauda do cometa, que é uma medida de genotoxicidade, pode ser influenciado por vários fatores, como o tempo de desenovelamento do DNA antes da eletroforese (PROVOST et al., 1993, 1997).

O relaxamento da condensação e as quebras na estrutura molecular são ocasionados por danos diretos à molécula de DNA (COLLINS et al., 2008; ROJAS et al., 1999). O ensaio cometa é uma ferramenta importante para as demonstrações de genotoxicidade de exposições a contaminantes e para investigar os impactos na integridade do DNA, reparo e recuperação em espécies de interesse ambiental (BELPAEME et al., 1998).

9. NEUROTOXICIDADE DE AGROQUÍMICOS

As manifestações da neurotoxicidade dos agroquímicos podem ser verificadas pelos sinais de intoxicação do animal e pelo ensaio de uma enzima considerada biomarcadora clássica de intoxicação neurológica, a acetilcolinesterase (AChE).

A acetilcolinesterase, que está presente no tecido muscular e cerebral, é uma enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, formando colina e ácido acético. Quando a atividade da AChE é inibida ocorre um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, o que pode paralisar algumas funções vitais do organismo (STENESH, 1998). A AChE é um biomarcador específico para carbamatos e organofosforados, porém ela pode ser inibida ou estimulada por outras substâncias, como metais e organoclorados (PAYNE et al., 1996; MARTINEZ-TABCHE et al., 1998; AKAISHI et al., 2004).

A inibição ocorre de forma irreversível por organofosforados, devido à formação de um complexo enzimático muito estável e de forma reversível por carbamatos (ADAMS, 1992).

10. INDICADORES HISTOPATOLÓGICOS DE TOXICIDADE

A histopatologia é uma ferramenta útil que pode demonstrar efeitos decorrentes da exposição a substâncias estranhas em um sistema biológico (xenobióticos) (MYERS & FOURNIE, 2002). A utilização da histopatologia em avaliações ambientais permite detectar os efeitos agudos e crônicos de exposição dos indivíduos à xenobióticos, pois permite avaliar seus efeitos diretamente ao nível das células e tecidos (HINTON et al., 1992).

Segundo Akaishi et al. (2004), os biomarcadores histopatológicos, juntamente com os parâmetros bioquímicos, permitem analisar as respostas fisiológicas dos indivíduos, assim como estabelecer o grau de toxicidade dos contaminantes.

O fígado representa um órgão alvo importante e adequado para análises patológicas na procura de danos aos tecidos e células, já que possui um papel chave no metabolismo e subsequente excreção de xenobióticos. Considerado a maior glândula do corpo humano, esse órgão é essencial para a homeostase do organismo sob condições ambientais variáveis (MELA et al., 2007; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002).

Em estudos histopatológicos, as brânquias são importantes, pois entram em contato direto com o estressor e são envolvidas em diversas funções, como as trocas gasosas, osmorregulação, regulação ácido-base e excreção de compostos nitrogenados (EVANS et al., 2005). Diversas alterações morfológicas podem ser observadas em brânquias de peixes expostos a contaminantes, como hipertrofias, hiperplasias, descolamento epitelial, dilatação dos vasos sanguíneos, necroses, hemorragias, fusão

lamelar, aneurismas, proliferação de células cloreto, proliferação de células mucosas e hipersecreção de muco (MACHADO, 1999).

11. LIBÉLULAS (INSECTA, ODONATA)

Entre a classe Insecta, encontra-se a ordem Odonata, que é composta por insetos alados com cores vivas e vibrantes, conhecidos como libélulas ou lavadeiras, possuem dependência direta de água no estágio larval e indireta na fase adulta, pois estão relacionados a ambientes límnicos devido ao comportamento reprodutivo (BORROW et al., 1964). Dessa forma, podendo facilmente ser encontrados em rios, lagos e diversos ambientes aquáticos, incluindo viveiros de piscicultura.

Os insetos dessa ordem possuem corpo longo, que pode ir de 20 mm a 160 mm de comprimento, a cabeça é grande, facilitando o movimento, quase que toda recoberta por olhos, possui antenas muito curtas e apresenta aparelho bucal mastigador com mandíbulas fortes e robustas, o corpo divide-se em cabeça, tórax e abdômen, as pernas são longas e as asas translúcidas (RUPPERT & BARNES, 2005).

Seu ciclo de vida é dividido em diversas fases, sendo que a fase jovem é aquática (Figura 5A) e a fase adulta é alada (Figura 5B) (CARVALHO et al., 1998). Existem aproximadamente 5000 espécies conhecidas de náíades e seu desenvolvimento larval pode demorar até cinco anos, pois para que ocorra a metamorfose que direciona a fase adulta são necessárias condições ambientais favoráveis, como substratos interligando o ambiente aquático com o terrestre (GALLO et al., 1988).

O comportamento territorial e reprodutivo dessas espécies pode ser observado durante o período da manhã (06 às 13h), como a temperatura e a luminosidade que oscilam ao longo do dia, estima-se que esses fatores determinam o período de atividades das espécies (IRUSTA, 2007).

A reprodução das náíades de libélula é sexuada e de fecundação direta, machos e fêmeas se aglomeram perto de áreas que possuam uma fonte de água. É na água ou em vegetação aquática que ocorre a ovoposição (IRUSTA et al., 2007). O autor ainda descreve que os principais métodos de postura de náíades na água são: indireto, no qual se utiliza a vegetação como substrato de postura, direto, no qual a fêmea bate o abdômen na superfície da água liberando os ovos e ainda, aéreo, onde a fêmea libera os ovos sobre superfícies aquáticas através de voos circulares e rasantes.

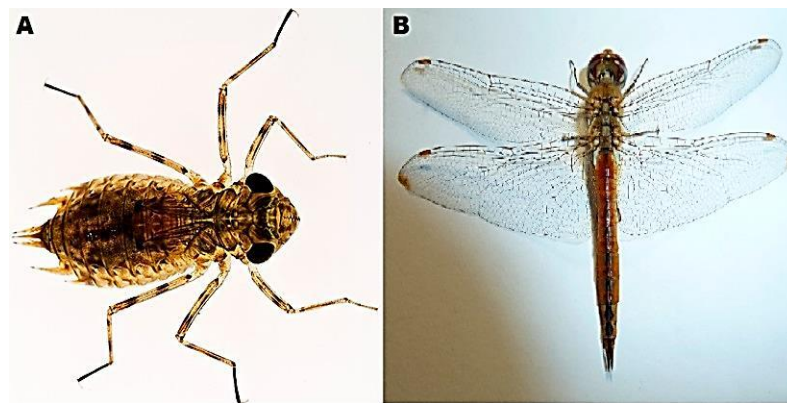


FIGURA 5. Exemplar de *P. flavescens*. A) Náide – Fase jovem. B) Libélula adulta. Fonte: SOUZA et al. (2007)

12. JUNDIÁ CINZA (*Rhamdia quelen*)

Juntamente com o desenvolvimento da aquicultura em nível mundial, as pesquisas envolvendo o jundiá (*Rhamdia quelen*) (Figura 6) vêm crescendo em conjunto com esse avanço, por tratar-se de um modelo biológico de fácil manipulação reprodutiva e grande potencial zootécnico (KOAKOSKI et al., 2012; ADAMES et al., 2015).

É classificado como pertencente à ordem dos siluriformes, família Heptapteridae e ao gênero *Rhamdia*, sendo a espécie *Rhamdia quelen*. Possui grande abrangência geográfica, ocorrendo desde o sudoeste do México ao centro da Argentina, possuindo assim diversas sinonímias (GOMES et al., 2000). São peixes com hábitos bentônicos e noturnos preferindo fundos próximos à margem e vegetação (GOMES et al., 2000).

A alimentação do *Rhamdia quelen* em ambiente natural baseia-se em invertebrados (crustáceos, anelídeos e insetos), restos vegetais, sedimentos, escamas e peixes, o que caracteriza um hábito alimentar onívoro e generalista (GOMIEIRO et al., 2007). O que o faz aceitar muito bem dietas artificiais tanto de origem animal quanto de origem vegetal.

Durante o período de reprodução, que ocorre juntamente com o aumento de temperatura (GHIRARDELLI et al., 2007), formam-se de cardumes nas áreas de desova que em geral são em águas rasas, limpas, com pouca corrente e fundo pedregoso (GOMES et al., 2000). As fêmeas desovam de forma parcelada, ou seja, mais de uma vez dentro de um mesmo período reprodutivo e em sincronia com a espermição dos machos (GOMES et al., 2000). Após a fecundação, a eclosão dos ovos ocorre cerca de

26h (DE AMORIM et al., 2009) e o crescimento é rápido e acentuado nos primeiros anos de vida (GOMES et al., 2000).

Possui uma boa aceitação do mercado consumidor, por apresentar bom rendimento de filé, sabor agradável e ausência de espinhos intramusculares (CARNEIRO et al., 2004). É um peixe neotropical de grande valor na América do Sul, com grande importância ecológica e produtiva na aquicultura (KOAKOSKI et al., 2012). Por isso, estudos para o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem e facilitem a produção de formas jovens são de extrema importância (ANDRADE & YASUI, 2003).

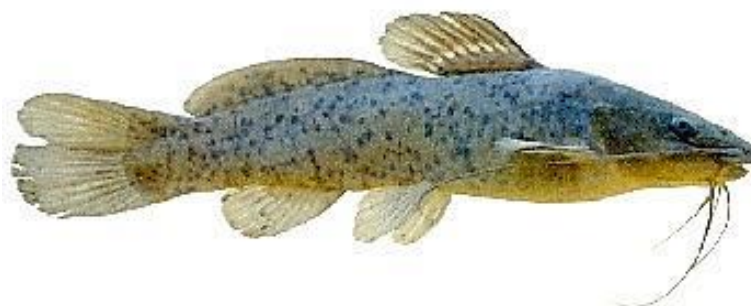


FIGURA 6. Jundiá (*Rhamdia quelen*) adulto. Fonte: MELLO e AMBROSANO. (2011)

13. REFERÊNCIAS

- ADAMES, M.S.; TOLEDO, C.P.R.; NEUMANN, G.; BUZZI, A.H.; BURATTO, C.N.; PIANA, P.A.; BOMBARDELLI, R.A. 2015 Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, 161(1): 119-128.
- ADAMS, H. R. **Drogas que atuam sobre o sistema nervoso somático e autonômico**. In: Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. BOOTH N. H.; MCDONALD, L.E. (eds). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992.
- AKAISHI, F. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; JAKOBI, S. C. G.; et al. **Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (wsf) of crude oil**. Archives of Environmental and Toxicology, v. 46, p. 244–253, 2004.
- ALMEIDA, Tatiane Nantes de. **Contaminação por agrotóxicos carbamatos e organofosforados em água para consumo humano de Dourados, MS, 2008 a 2009. 2010**. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca.
- AL-SABTI, K., & METCALFE, C. D. (1995). **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water**. Mutation Research/Genetic Toxicology, 343(2-3), 121-135.
- ANDRADE, Dalcio Ricardo; YASUI, George Shigueki. **Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. SIA - sistema de informações sobre agrotóxicos. In: **Relatório do ingrediente ativo ametrina**. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp?iVarAux=1&CodIng=22>. Acesso em: 16/11/2016.

- BEGUM G. 2005. **In vivo biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure.** Pesticide Biochemical and Physiology 82:185-196.
- BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. **Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish.** Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 415, n. 3, p. 167-84, 1998.
- BERNARDI M.M., MORAES R.C., VAROLI F.M.F. & OSTI S.C. 2008. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária.** Manole, São Paulo. 942p.
- BERTOLETTI, E., 1990, **Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais.** Cienc. Cult., 42: 271-277.
- BISWAS, K. CHATTOPADHYAY, I., BENERJEE, R.K., BANDYOPADHYAY, U. **Biological activities and medicinal properties of nim (*Azadirachta indica*).** Current Science, v. 82, n. 11, p. 1336-1345. 2002.
- BOGORNÍ, Paulo César et al. **Avaliação do efeito do ácido pirolenhoso de três espécies arbóreas sobre *Tuta absoluta*.** Bioikos, v. 22, n. 2, p. 109-115, 2008.
- BOLS N.C., BRUBACHER J.L., GANASSIN R.C. & LEE L.E. 2001. **Ecotoxicology and innate immunity in fish.** Dev. Comp. Immunol. 25:853-873.
- BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. **Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholisgunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland.** Chemosphere, v. 44, n. 3, p. 383-392, 2001.
- BORGES, A. **Changes in hematological and serum biochemical values in *Jundiá Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cipermetrin.** Chemosphere, v. 69, p. 920-926, 2007.
- BORROW, J. B. & D. M. DELONG, 1964. **Introdução ao estudo dos insetos.** Edgard Blücher. Nova York.
- BRABO, M. F., PEREIRA, L. F. S., SANTANA, J. V. M., CAMPELO, D. A. V., & VERAS, G. C. (2016). **Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura.** Acta of Fisheries and Aquatic Resources, 4(2), 50-58.

- BRACCO, J. E., DALBON, M., MARINOTTI, O., & BARATA, J. M. S. (1997). **Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus***. Revista de Saúde Pública, 31(2), 182-183.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. (2013a). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Brasília: República Federativa do Brasil.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. (2013b). **Censo aquícola nacional, ano 2008**. Brasília: República Federativa do Brasil.
- BUCKUP, P. A., MENEZES, N. A., & GHAZZI, M. S. A. (2007). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (Vol. 1)**. Rio de Janeiro: Museu Nacional.
- BUTTERWORTH, J. H., & MORGAN, E. D. (1968). **Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts**. Chemical Communications (London), (1), 23-24.
- CALDAS, E. D., & SOUZA, L. C. K. R. (2000). **Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira**. Rev. Saúde Pública, 34(5), 529-537.
- CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D.; BENDHACK, F.; IGNÁCIO, S.A. **Processamento do jundiá *Rhamdia quelen*: rendimento de carcaça**. Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais, v.2, n.3, p.11-17, 2004.
- CARVALHO, A. L., & MESSIMIAN, J. L. (1998). **Odonata do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: habitats e hábitos das larvas**. Oecologia brasiliensis, 5(1), 1.
- COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G. et al. **The comet assay: topical issues**. Mutagenesis, v. 23, n. 3, p. 143-51, 2008.
- DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- DELGADO, C. et al. **Densidad de larvas de odonatos (Insecta) em un estanque de piscicultura en Iquitos**. Rev. Peru. Entomol., Lima, v. 37, p.101-102, 1995.

- EVANS, D.H.; PERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. **The multifunctional fish gill:** dominant site of gas Exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, v.85, p.97-177, 2005.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014a). **The state of world fisheries and aquaculture:** opportunities and challenges. Roma: FAO
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.(2014b). **Fishery and aquaculture statistics 2012.** Roma: FAO yearbook
- GALLO, D., O. NAKANO, S.S. NETO, R.P.L. CARVALHO, G.C. BATISTA, E.B. FILHO, J.R.P. PARRA, R.A. ZUCCHI, S.B. ALVES & J.D. VENDRAMIM. 1988. **Manual de entomologia agrícola.** São Paulo, CERES, 649p.
- GHIRALDELLI, L. MACHADO, C., FRACALLOSSI, D.M., ZANIBONI FILHO, E. **Desenvolvimento gonadal do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Siluriformes), em viveiros de terra na região sul do Brasil.** *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, v. 29, n. 4, p.349-356, 2007.
- GOMES, Levy de Carvalho et al. **Biology of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pemelodidae).** *Ciência Rural*, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.
- GOMIERO, Leandro Muller; SOUZA, Ursula Pereira; BRAGA, Francisco Manoel de Souza. **Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP.** *Biota Neotropica*, p. 127-133, 2007.
- GONÇALVES A. A. (Org.) (2011). **Tecnologia do pescado:** ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Editora Atheneu.
- HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A. & OKIHIRO, M.S. **Biomarkers:** Biochemical, Physiological, and histopathological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, p. 155-208, 1992.
- IRUSTA, J. B.; ARAÚJO, A. **Título: Ecologia comportamental reprodutiva de *Diastatops obscura* Fabricius (Insecta, Odonata).**, p. 39, 2007.
- JAENSSON, A., SCOTT, A.P., MOORE, A., KYLIN, H. & OLSÉN, K.H. 2007. **Effects pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours**

and reproductive behavior in male pair of brown trout (*Salmo trutta* L.),
Aquat.Toxicol., 81: 1-9.

JOBLING, M. (1995). **Simple indices for the assessment of the influences of social environment on growth performance, exemplified by studies on Arctic charr.** Aquaculture International, 3(1), 60-65.

KOAKOSKI, G., OLIVEIRA, T. A., DA ROSA, J. G. S., FAGUNDES, M., KREUTZ, L. C., & BARCELLOS, L. J. G. (2012). **Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages.** Physiology & behavior, 106(2), 129-132.

KUBITZA, F., CAMPOS, J. L., ONO, E. A. & ISTCHUK, P. I. (2012). **Panorama da piscicultura no Brasil:** estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. Panorama da Aquicultura, 22(132): 14-25.

KUBITZA, Fernando. **Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos.** Panorama da Aquicultura, v. 14, n. 82, p. 27-39, 2004.

MACHADO, M. R. **Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas.** UNOPAR científica, ciências biológicas e da saúde. Londrina, v.1, p.63-76, 1999.

MARTINEZ-TABACHE, L.; RAMÍREZ, B. M.; GERMÁN-FAZ, C.; DIAZ-PARDO, E. **Acetylcholinesterase activity of the freshwater cladoceran, *Moina macrocopia*, used as an in vitro screening tool for water quality.** AquatEcos Health Managem, v. 1, p. 317-322, 1998.

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

MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. **Biological markers of environmental contamination.** In: MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (Eds.), **Biomarkers of Environmental Contamination.** Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3–16, 1990.

MELA, M.; RANDI, M. A. F.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. **Dietary and sub-chronic effects of**

- methylmercury on neotropical fish *Hoplias malabaricus*.** Ecotoxicology Environmental Safety, v. 68, p. 426-435, 2007.
- MENEZES, José Roberto Rezende de; YANCEY, Dean Romain. **Manual de criação de peixes.** Campinas-SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1998. 117 p.
- MIYASAKA, Shiro; OHKAWARA, Takemi; UTSUMI, Beatriz. **Ácido Pirolenhoso: uso e fabricação.** Boletim Agroecológico, nº 14, dezembro de 1999.
- MONTANHA, F. P., PIMPÃO, C. T., & Titular-PUCPR, M. V. (2012). **Efeitos toxicológicos de piretroides (Cipermetrina e deltametrina) em peixes-Revisão.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, (18), 1-58.
- MONTEIRO, D. A., RANTIN, F. T., & KALININ, A. L. (2009). **The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Bryconcephalus* () exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion).** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 149(1), 40-49.
- MORDUE (Luntz), A.J. & A. BLACKWELL. 1993. **Azadirachtin: An update. J. Insect Physiol.** 39: 903-924.
- MORDUE, L.A.J., MORGAN, E.D. & NISBET, A.J. 2010. **Addendum: Azadirachtin, a natural product in insect control: An update.** In: Gilbert, L.I. & Gill, S.S. (Eds) Insect Control. 204–206. Elsevier, Oxford, U.K.
- MYERS, M.S. & FOURNIE, J.W. **Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors.** In: Biological indicators of aquatic ecosystem stress (Adams S.M.). American Fisheries Society, v. 24, p. 221-287, 2002.
- NACCI, D. E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. **Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay.** Aquatic Toxicology, v. 35, p. 197-210, 1996.
- ODUM, Eugene Pleasants; BARRETT, Gary W. **Fundamentos da Ecologia.** Filadélfia: Saunders, 1971.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; ASSIS, H. C. DA S. DE; et al. **Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish**

- (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 51, n. 3, p. 161-7, 2002.
- PATCHINEELAM, S. M.; SANDERS, C. J.; SMOAK, J. M. et al. **A Historical Evaluation of Anthropogenic Impact in Coastal Ecosystems by Geochemical Signatures.** Journal of Brazilian Chemistry Society, v. 22, n. 1, p. 120-125, 2011.
- PAYNE, J. F.; FRANCEY, L.; RAHIMTULA, A.; PORTER, E. **Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring.** Comparative Biochemistry and Physiology C, 86: 233-245, 1987.
- PIMPÃO, C. T.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. **Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei).** Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 88, p. 122-127, 2007
- POLAT H., ERKOÇ F.U., VIRAN R. & KOÇAK O. 2002. **Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*.** Chemosphere 49:39-44.
- PROVOST, G. S.; KRETZ, P. L.; HAMNER, R. T. et al. **Transgenic systems for in vivo mutation analysis.** Mutation Research, v. 288, n. 1, p. 133-49, 1993.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. **Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications.** Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications, v. 722, n. 1-2, p. 225-54, 1999.
- RUPPERT, E. E., R. S. FOX & R. D. BARNES, 2005. **Zoologia dos Invertebrados.** Sétima edição. Editora Roca, São Paulo. 1145 p.
- SANTIAGO-MOREIRA, M. R., MUCCI, J. L. N., CISCATO, C. H. P., MONTEIRO, S. H., & ABAKERLI, R. B. (2013). **Estudo do inseticida carbofurano em solo e sedimento de área de produção de arroz irrigado e controle do gorgulho aquático *Oryzophagus oryzae*, Taubaté, São Paulo, Brasil.** Arquivos do Instituto Biológico.
- SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. **Piretroides - uma visão geral.** Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

- SCORVO FILHO, João Donato et al. Desempenho produtivo do pintado, *Pseudoplatystomacorruscans* (Spix&Agassiz, 1829), submetidos a diferentes densidades de estocagem em dois sistemas de criação: intensivo e semi-intensivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 2, p. 181-188, 2008.
- SELVI, M.; SARIKAYA, R.; ERKOÇ, F.; KOÇAK, O. **Acute toxicity of the cyfluthrin pesticide on guppy fish**. *Environmental Chemistry Letters*, 2008.
- SIDONIO, L., CAVALCANTI, I., CAPANIMA, L., MORCH, R., MAGALHÃES, G., LIMA, J., ... & MUNGIOLI, R. (2012). **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. BNDES setorial, 35, 421-463.
- SILVA, A. S.; ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; MENDONÇA, L. A. **Qualidade de mudas de eucaliptos tratadas com Extrato pirolenhoso**. *Revista Cerne*, v. 12, n. 1, p. 19-26, 2006.
- SINGH, P. B.; SINGH, V. **Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17 β and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustesfossilis* (Bloch)**. *Chemosphere*, v. 72, p. 422- 431, 2008.
- STENESH, J. **Biochemistry**, Plenum Press. New York, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; MORAES, F. R.; CARNEIRO, P. C. F. **Physiological responses of “Tambaqui” *Colossomamacropomum* (Characidae) toacute stress**. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 43-48, 2001.
- TAVE, D. et al. **Effect of body color of *Oreochromismossambicus* (Peters) on predation by dragonfly nymphs**. *Aquac.Fish.Manag.* Oxford, v.21, n.2, p.157-161, 1990.
- TOMAZELLI JR, O. FRANCO, G. M. S., CASACA, J. M., MUNARINI, A. C., & DAL MAGRO, J. (2011). **Efeito do Extrato de *Meliaazedarach* sobre a predação de alevinos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) por larvas de *Neuraeschna* (Odonata: Aeshnidae)**. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 15(1), 19-25.
- VELISEK, J.; JURCIKOVÁ, J.; DOBSIKOVÁ, R.; SVOBODOVÁ, Z.; PIACKOVÁ, V.; MÁCHOVÁ, J.; NOVOTNY, L. **Effects of deltamethrin on rainbow trout**

(*Oncorhynchus mykiss*). Sciencedirect. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 23, p. 297-301, 2007.

WOYNAROVICH, E., & HORVÁTH, L. (1983). **Propagação artificial de peixes de águas tropicais manual: de extensão**. In Propagação artificial de peixes de águas tropicais manual: de extensão. FAO/ CODEVASF/ CNPq.

YILMAZ M., GUL A. & ERBASLI K. 2004. **Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859)**. Chemosphere 56:381-385

ZANETTI, M.; CAZETTA, J. O.; MATTOS JÚNIOR, D.; CARVALHO, S. A. **Influência do Extrato pirolenhoso na calda de pulverização sobre o teor foliar de nutrientes em Limoeiro 'Cravo'**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 26, n. 3, p. 529-533, 2004.

ZANIBONI FILHO, E. 2000. **Larvicultura de peixes de água doce**. Informe agropecuário. Belo Horizonte. 21(203): 69-77.

CAPÍTULO II

Controle químico de ninfas de libélula (Insecta, Odonata) durante a larvicultura do
Jundiá (*Rhamdia quelen*)

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é um setor da economia que está em intenso e constante desenvolvimento (FAO 2016a), devido ao avanço da piscicultura, protocolos que garantam o sucesso da larvicultura de peixes necessitam de aprimoramento ou até mesmo de desenvolvimento.

Os empasses na larvicultura de peixes em geral, começam nos viveiros, quando surgem problemas relacionados com a predação de larvas e alevinos por diferentes espécies de invertebrados aquáticos (SANTOS et al., 1988). Dentre aos diversos predadores, as larvas de insetos da ordem odonata são uma grande ameaça. Os prejuízos causados pelas náíades de odonata na piscicultura podem ir de uma pequena taxa de diminuição a até a perda total da produção de alevinos, durante os primeiros dias de criação nos viveiros escavados (TAVE et al., 1990). Esse hábito extremamente predatório das náíades de odonata constitui um problema em nível internacional na larvicultura de diferentes espécies de peixes (SANTOS, et al., 1988).

As formas jovens de odonata exercem um papel importante na dinâmica dos ecossistemas aquáticos, sendo considerado um dos principais predadores em lagos e em viveiros de piscicultura (MARCO et al., 1999), pois atuam como predadores de outros invertebrados e larvas de peixes (SOARES et al., 2001).

O controle das populações destes predadores tem merecido destaque pela comunidade científica, pois não existem protocolos efetivos voltados à prevenção ou ao impedimento da predação das larvas de peixes por esses insetos. Protocolos rudimentares, como o emprego de redes ou malhas sobre a superfície da água para evitar a postura direta de ovos, têm sido empregados, contudo, esses métodos são pouco eficazes, pois as náíades adultas realizam a postura indireta (MENEZES E YANCEY, 1998).

Tendo em vista, a possibilidade de ocorrência de grandes perdas na produção de alevinos, que pode chegar a até 100% (ZANIBONI et al.; 2000), muitos produtores têm empregado protocolos que envolvem a aplicação de agroquímicos diretamente na água dos viveiros de criação (MATAQUEIRO et al., 2002). Apesar de serem considerados de alta toxicidade (FANTA et al., 2003; SANTOS et al., 2007)), os organofosforados têm sido largamente empregados nesses protocolos (MONTEIRO et al., 2007), podendo acarretar em diversos tipos de desordens nos indivíduos, nos ecossistemas e até mesmo

nos humanos (SANTIAGO-MOREIRA, 2013). Esses problemas têm motivado pesquisas recentes com o objetivo compreender os efeitos desses agroquímicos sobre os organismos vivos e suas interações nos ecossistemas aquáticos e, especialmente, na busca por alternativas menos agressivas, como o emprego de substâncias naturais ou até mesmo agroquímicos menos invasivos e/ou biodegradáveis.

Dentre várias espécies de peixes neotropicais, cuja produção sofre danos pela ação destes predadores, o jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de grande importância na aquicultura da América do Sul devido às suas boas taxas de crescimento e adaptação aos ambientes de criação (KOAKOSKI et al., 2012), e nos últimos anos, têm sido amplamente empregado como modelo biológico para experimentação em diversas áreas, como a aquicultura (MEWES, et al., 2016), a fisiologia (ADAMES et al., 2015) e até mesmo a toxicologia (DE ANDRADE BRITO et al., 2017).

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência do paration metílico, Cipermetrina, Azadiractina e Extrato pirolenhoso no controle de náíades de odonata durante a larvicultura do jundiá (*Rhamdia quelen*) e, seus possíveis efeitos genotóxicos, neurotóxicos e histopatológicos sobre os peixes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a eficiência do paration metílico, cipermetrina, azadiractina e extrato pirolenhoso no controle de náíades de odonata durante a larvicultura do jundiá (*Rhamdia quelen*) e seus possíveis efeitos genotóxicos, neurotóxicos e histopatológicos sobre os peixes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a dose mínima efetiva de cada produto empregado no controle das náíades de odonata;
- Indicar o percentual de sobrevivência dos peixes expostos às náíades de libélula e em água contendo os produtos na dosagem mínima efetiva;
- Verificar as possíveis alterações morfológicas no tecido hepático e nas brânquias causados pelos diferentes produtos;

- Avaliar os efeitos genotóxicos desses produtos sobre os peixes, por meio da mensuração dos índices de fragmentação de DNA pela técnica do ensaio cometa;
- Analisar os efeitos desses produtos sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase nos alevinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL, DURAÇÃO DO EXPERIMENTO E ORIGEM DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná *Campus* de Toledo – PR (Unioeste). As náíades de odonata (*P. flavescens*) foram coletadas em viveiros escavados de 200m², revestidos de alvenaria e com fundo de terra, com o auxílio de rede de malha 1,0mm.

Após as coletas, as náíades foram alojadas em aquário de vidro com volume útil de 70L, com aeração e controle da temperatura por meio de aquecimento elétrico (26,0±1,0°C). Na parte superior dos aquários foram instaladas telas para evitar a fuga dos insetos.

As náíades foram alimentadas diariamente, uma vez ao dia com larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes de piscicultura comercial. A identificação e a classificação das espécies de náíades de odonata coletadas foram realizadas de acordo com chaves dicotômicas propostas por SOUZA et al. (2007).

As larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) foram obtidas por meio de reprodução artificial realizada no mesmo laboratório, empregando-se a manipulação hormonal de machos e fêmeas com extrato pituitário de carpa, segundo TESSARO et al. (2012) e ADAMES et al. (2015).

Com 48 horas de vida, as larvas de *R. quelen* foram alimentadas com náuplios de *Artemia salina*, a uma taxa de 100 náuplios/larva/dia, divididas em cinco alimentações. Essas larvas foram criadas até o 5º dia de vida, sendo utilizadas nos experimentos.

3.2 PRODUTOS UTILIZADOS

Os agroquímicos/contaminantes utilizados nesta pesquisa foram o Paracap 450 CS[®] (45% de Paration metílico), Cipermetrina Nortox 250 EC[®] (25% de cipermetrina), óleo de nim TerraNim[®] (23% de Azadiractina) e o Extrato pirolenhoso Ecopirol[®].

3.3 EXPERIMENTO I: DETERMINAÇÃO DAS DOSES LETAIS E PARA INDUÇÃO À LETARGIA

Neste experimento, as náíades de odonata foram alojadas em aquários plásticos de volume útil de 1L, em uma densidade de três indivíduos por aquário. Todos os aquários possuíam aeração por meio de ar comprimido. A água utilizada nesses aquários era proveniente de poço artesiano e apresentava 0,03 mg de amônia/L, 0,01 mg de nitrito/L, pH 7,2 e 7 mg de oxigênio dissolvido/L.

Nesses aquários, individualmente, foram adicionados 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1.000 µL/L de cada um dos produtos testados. Esses volumes corresponderam a diferentes concentrações de paration metílico, cipermetrina, azadiractina e extrato pirolenhoso (Tabela 1). Após o início da exposição dos insetos aos diferentes tratamentos foi mensurado o tempo necessário para promover 100% da mortalidade das náíades. Nos tratamentos em que não foi possível verificar a mortalidade dos insetos, mas sim a redução da atividade motora, considerou-se esse comportamento como letárgico.

Tabela 1. Volumes dos produtos utilizados e diferentes concentrações do princípio ativo

Dose (μ L/L)	Produto			
	Paration Metílico	Cipermetrina	Azadiractina	Extrato pirolenhoso
	Concentração do princípio ativo (mg/L)			
1000	450	250	2,3	1000
900	405	225	2,07	900
800	360	200	1,84	800
700	315	175	1,61	700
600	270	150	1,38	600
500	225	125	1,15	500
400	180	100	0,92	400
300	135	75	0,69	300
200	90	50	0,46	200
100	45	25	0,23	100
95	42,75	23,75	0,2185	95
90	40,5	22,5	0,207	90
85	38,25	21,25	0,1955	85
80	36	20	0,184	80
75	33,75	18,75	0,1725	75
70	31,5	17,5	0,161	70
65	29,25	16,25	0,1495	65
60	27	15	0,138	60
55	24,75	13,75	0,1265	55
50	22,5	12,5	0,115	50
45	20,25	11,25	0,1035	45
40	18	10	0,092	40
35	15,75	8,75	0,0805	35
30	13,5	7,5	0,069	30
25	11,25	6,25	0,0575	25
20	9	5	0,046	20
15	6,75	3,75	0,0345	15
10	4,5	2,5	0,023	10
5	2,25	1,25	0,0115	5

3.4 EXPERIMENTO II: TESTES DE PREDACÃO

Com base nos resultados do primeiro experimento foram escolhidas cada uma das doses mínimas efetivas para a realização de testes de predação de larvas de jundiá pelas náíades na presença de cada um dos produtos.

Nesse experimento, 270 larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) e 27 náíades de odonata foram distribuídas em 27 aquários de plástico com volume útil de 1L. Esse experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por nove tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram constituídos pela exposição das larvas e das náíades em água contendo diferentes concentrações de cada um dos produtos testados (Tabela 2). Dessa maneira, foi considerado como uma unidade experimental, um aquário contendo 10 larvas de jundiá e uma Náíade de odonata.

Tabela 2. Doses utilizadas nos testes de predação em diferentes concentrações do princípio ativo

Dosagem	
Produto comercial (µL/L)	Princípio ativo (mg/L)
Água	---
5 µL de Paracap 450 CS [®]	2,25 mg de Parationmetílico
10 µL de CipermetrinaNortox 250 EC [®]	2,5 mg de Cipermetrina
30 µL de óleo de nimTerraNim [®]	0,069 mg de Azadiractina
25 µL de óleo de nimTerraNim [®]	0,058 mg de Azadiractina
20 µL de óleo de nimTerraNim [®]	0,046 mg de Azadiractina
20 µL de ExtratopirolenhosoEcopirol [®]	---
15 µL de ExtratopirolenhosoEcopirol [®]	---
10 µL de ExtratopirolenhosoEcopirol [®]	---

A água utilizada nesse experimento apresentava 0,02 mg de amônia total/L, 0,01 mg de nitrito/L, pH 7,1 e 7,8 mg de oxigênio dissolvido/L.

Após 450 minutos de exposição das larvas e das náíades (tempo para promover 100% de mortalidade dos insetos) aos diferentes tratamentos, foi realizada a contagem das larvas remanescentes em cada um dos aquários. A partir desses dados, foi calculado a taxas de consumo de larvas de jundiá pelas náíades, os quais foram expressos em percentual. Somente nas unidades experimentais em que não foi adicionado nenhum produto a contagem das larvas foi realizada após 90 minutos, porque nesse tempo houve 100% do consumo das larvas.

3.5 ENSAIO III: LARVICULTURA DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) COM EXPOSIÇÃO A CONTAMINANTES

Foram utilizadas quatro mil larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) com 120 horas pós-eclosão (HPE), distribuídas aleatoriamente em 20 aquários com volume total de 70L, equipados com sistema de aeração. Semanalmente foram mensurados os teores de amônia total ($0,02 \text{ mg/L} \pm 0,03$), nitrito ($0,01 \text{ mg/L} \pm 0,03$), pH ($7,0 \pm 0,21$) e oxigênio dissolvido ($6,5 \text{ mg/L} \pm 1,17$).

Aleatoriamente foram distribuídas 200 larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) por aquário. Optou-se por submetê-las imediatamente aos tratamentos, ou seja, sem período prévio de adaptação, pois os produtores de alevinos não utilizam desse processo. As dosagens de cada produto (Tabela 3) foram aplicadas pela manhã, durante todo o período experimental em intervalos de 7 dias. Este intervalo de tempo foi empregado porque corresponde ao intervalo tempo entre a postura e a eclosão dos ovos.

As larvas foram alimentadas com uma dieta à base de *Artemia salina* (150 náuplios/larva/dia) juntamente com ração comercial em pó contendo 42% de proteína bruta, distribuídas em quatro alimentações diárias até o 20º dia de larvicultura, após este período, as larvas receberam ração comercial micro extrusada 1,0 mm (Unua alevino Nutricon®).

Diariamente foi realizada a substituição de 5% do volume da água e, realizada a limpeza dos aquários para retirar fezes, restos de alimentos e larvas mortas. O período experimental teve duração de 30 dias. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos pela exposição das larvas a diferentes concentrações de diferentes agroquímicos (Tabela 3). Foi considerado como uma unidade experimental um aquário contendo 200 larvas de *Rhamdia quelen*.

Tabela 3. Dosagens de diferentes produtos para o controle de náíades, aplicados semanalmente na água durante a larvicultura do jundiá (*Rhamdia quelen*)

PRODUTO	DOSE ($\mu\text{L/L}$)	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
Controle	----	----
ParationMetílico	5	2,25
Cipermetrina	10	2,50
Azadiractina	20	0,04
Extrato pirolenhoso	10	10,0

3.5.1 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Três alevinos de cada unidade experimental foram anestesiados por meio da imersão em 250mg de benzocaína/L e eutanasiados por meio da secção da medula cervical e, em seguida, dissecados para obtenção do fígado e das brânquias. Os fígados e as brânquias foram fixados e mantidos em solução de Karnovsky (paraformol 8% + glutaraldeído 25% + tampão fosfato de Sorensen com ph 7,4) até o momento do processamento das amostras.

Para tanto, os tecidos foram desidratados por passagem em séries crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes semi seriados transversais, com 5 µm de espessura que foram corados com Hematoxilina-Eosina (H.E).

As patologias buscadas nas brânquias dos alevinos foram: descolamento do epitélio respiratório ou edema, proliferação celular ou hiperplasia do epitélio interlamelar (fusão das lamelas respiratórias), aneurisma ou congestão sanguínea, uniformidade das lamelas e dos rastros, presença de parasitas e alterações fisiológicas em geral (KORKMAZ et al., 2009). No fígado foram analisadas as ocorrências de hemorragias, hipertrofias, atrofias, hiperplasias, infiltração leucocitária, vacuolização, centros de melanomacrófagos, ocorrência de parasitas, alterações nucleares, necroses e neoplasias (VELMURUGAN et al., 2009).

As lâminas foram analisadas de forma qualitativa, sendo verificada a ocorrência de possíveis alterações histopatológicas, sendo quantificadas de acordo com Bernet (1999). Segundo o autor, a classificação recebe um grau de importância que varia de acordo com o grau de reversibilidade e extensão dos danos.

3.5.2 ELETROFORESE EM GEL DE CÉLULA ÚNICA (ENSAIO COMETA)

O ensaio cometa em eritrócitos foi realizado segundo o método proposto por Speit e Hartmann (1999), com modificações de Ferraro et al. (2004). De cada unidade experimental foram selecionados 12 alevinos que foram anestesiados e eutanasiados conforme descrito anteriormente, para depois ser realizada a coleta de sangue por meio de incisão branquial. O sangue coletado de cada peixe foi diluído em 0,25mL de soro bovino fetal, segundo Ramsdorf et al. (2009). Dessa suspensão de células, 20 µL

foram misturados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (LMP) e colocada em uma lâmina previamente coberta por agarose normal (1,5%). As lâminas foram mantidas por 48 horas a 4° C em uma solução de lise composta de NaCl (2.5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%).

Posteriormente as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (10N) e EDTA (200 mM), pH>13 por 25 minutos. A eletroforese foi realizada a 300 mA e 25 V por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas em 0,4M Tris, pH 7,5 e fixadas em etanol por 10 minutos. Os nucleóides foram corados com 0,02 g/mL de brometo de etídeo.

O dano no DNA foi medido utilizando microscópio de epifluorescência Leica® DMLS2 num aumento de 400x. Para cada peixe, 100 nucleoides foram visualmente classificados em 5 classes de danos (Figura 7) para a obtenção do escore de dano no DNA (variando de 0 a 400) de acordo com a metodologia descrita por Collins (2004), conforme a equação:

Escore de Danos

$$= [(nD\ 0)x0] + [(nD\ 1)x1] + [(nD\ 2)x2] + [(nD\ 3)x3] + [(nD\ 4)x4]$$

Onde:

nD0 = número de nucleóides em classe 0 de danos no DNA;

nD1 = número de nucleóides em classe 1 de danos no DNA;

nD2 = número de nucleóides em classe 2 de danos no DNA;

nD3 = número de nucleóides em classe 3 de danos no DNA;

nD4 = número de nucleóides em classe 4 de danos no DNA;

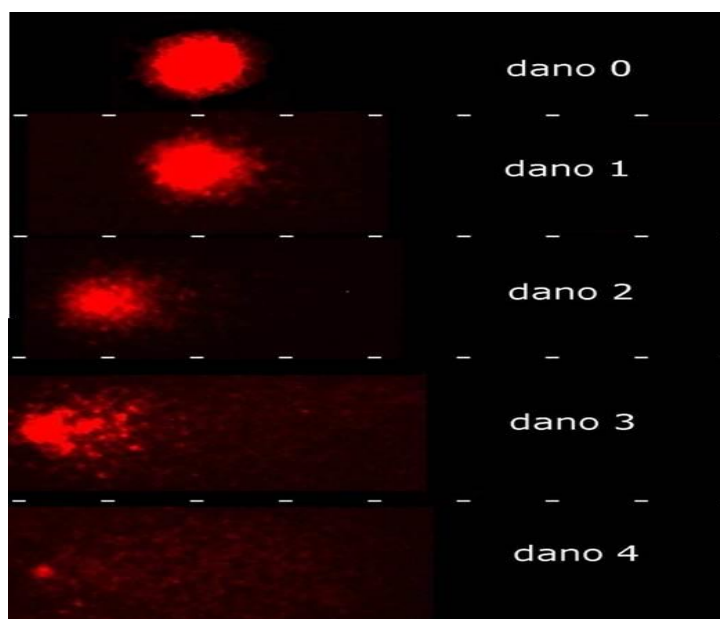


Figura 7. Ensaio cometa em eritrócitos de *Rhamdia quelen*. Classificação de danos causados no DNA, segundo Collins (2004). Fonte: Autor. (2016)

3.5.3 ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

A atividade da enzima acetilcolinesterase foi mensurada no músculo, conforme metodologia descrita por Elmann et al. (1961). Para tanto, outros 12 peixes de cada unidade experimental foram anestesiados e eutanasiados conforme descrito anteriormente. Os peixes foram dissecados para obtenção de amostras de músculo que foram mantidas sob congelamento à -20°C até o processamento da análise. Para a realização das análises, as amostras foram homogeneizadas em PBS (pH 7,0) e centrifugados a 10.000g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi diluído (1:10) em 0.1 M de tampão fosfato (pH 7.5). Depois da diluição, 50 µl foi colocado em uma microplaca de 96 espaços seguido por 200µl de DTNB (5,5-Ditio-bis-benzoato) e 50µl de ACT (acetiltiocolina iodada).

A absorbância foi imediatamente medida a 415 nm em intervalos de 5s pelo método de Ellman et al. (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Para o cálculo da porcentagem de inibição da acetilcolinesterase é realizada uma regra de três simples, onde a média da absorbância por minuto para o controle é considerado como sendo 100% de atividade e o valor que se quer obter é igual a X. Esse valor X obtido é subtraído de 100% para obter a porcentagem de inibição.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliação dos resultados, todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando verificado influência dos tratamentos ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de Tukey em nível de 5% de significância, exceto para os ensaios de eletroforese em gel de célula única (ensaio cometa) e atividade da enzima acetilcolinesterase, onde além da análise de variância, utilizou-se o teste T com o intuito de comparar as médias com o controle.

Também foram checados os pressupostos de homocedasticidade dos dados pelo teste de Levine e a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (Kéry & Hatfield 2003). Todas as análises foram realizadas pelo protocolo de modelos lineares generalizados do software *Statistica 7.0*®.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DAS DOSES LETAIS E PARA INDUÇÃO À LETARGIA

A partir da exposição das náíades de libélula (*Pantala flavescens*) aos produtos testados foram determinadas as doses que induzem ao efeito letal e/ou letárgico de cada produto, assim como o tempo em que as náíades demoram a entrar em óbito ou perderem a capacidade de movimentação (Tabela 4).

A cipermetrina e o paration metílico em doses entre 700 e 1.000 $\mu\text{L/L}$ causam mortalidade nas náíades em um tempo de até 30 minutos. Em dosagens menores, o tempo necessário para garantir a mortalidade das náíades foi superior, contudo, doses inferiores a 10 e 5 $\mu\text{L/L}$, respectivamente não causaram a mortalidade dos insetos.

Nenhuma das dosagens de azadiractina e extrato pirolenhoso causaram a mortalidade nas náíades, entretanto, observou-se um comportamento letárgico nos insetos e a perda da capacidade de movimentação.

Tabela 4. Tempo necessário para indução da mortalidade em náíades de libélulas (*P. flavescens*) expostas a diferentes concentrações de produtos agroquímicos/contaminantes.

Dose (µL/L)	Produto			
	Paration Metílico	Cipermetrina	Azadiractina	Extrato pirolenhoso
	Tempo (min)			
1000	30	30	---	---
900	30	30	---	---
800	30	30	---	---
700	30	30	---	---
600	60	60	---	---
500	60	60	---	---
400	60	60	---	---
300	90	90	---	---
200	90	90	---	---
100	240	240	---	---
95	240	240	---	---
90	240	240	---	---
85	270	270	---	---
80	270	270	---	---
75	270	270	---	---
70	330	330	---	---
65	330	330	---	---
60	330	330	---	---
55	330	330	---	---
50	330	330	---	---
45	330	330	---	---
40	360	360	---	---
35	360	360	---	---
30	420	420	---	---
25	420	420	---	---
20	420	420	---	---
15	420	420	---	---
10	450	450	---	---
5	450	---	---	---

4.2 TESTES DE PREDACÃO

A predação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) pelas náíades foi menor ($p < 0,05$) quando empregado 2,5 mg/L de Cipermetrina na água ($13,3 \pm 5,7\%$) e 2,25 mg/L de Paration Metílico ($26,7 \pm 5,7$). Por outro lado, mesmo que as náíades

apresentassem comportamento letárgico quando expostas à Azadiractina ou ao Extrato pirolenhoso, estes insetos ainda realizaram a predação (Tabela 5).

Tabela 5. Tempo e consumo de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) por náíades de libélula nos testes de predação

PRODUTO	DOSE (µl/L)	DOSE (mg/L)	TEMPO (min.)	CONSUMO (%)
Controle	0	0	90	93,3 ± 5,7 ^a
Paration Metílico	5	2,25	450	26,7 ± 5,7 ^c
Cipermetrina	10	2,5	450	13,3 ± 5,7 ^d
Azadiractina I	30	0,069	450	56,6 ± 5,7 ^b
Azadiractina II	25	0,058	450	56,6 ± 5,7 ^b
Azadiractina III	20	0,046	450	56,6 ± 5,7 ^b
Extrato pirolenhoso I	20	----	450	73,3 ± 11,5 ^{ab}
Extrato pirolenhoso II	15	----	450	76,6 ± 5,7 ^{ab}
Extrato pirolenhoso III	10	----	450	73,3 ± 11,5 ^{ab}
<i>P valor</i>				0,00

Dados de consumo expressos em percentual ± o desvio padrão. Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 LARVICULTURA DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) EXPOSTOS A CONTAMINANTES

4.3.1 MORTALIDADE

Durante o período experimental houve uma elevada mortalidade das larvas de *Rhamdia quelen* (tabela 5). Entretanto, não houve influência dos tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 6. Mortalidade das larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) durante a larvicultura de 30 dias com exposição aos contaminantes

Tratamento	Mortalidade (%)
Controle	87,37±4,42
Cipermetrina	88,37±2,49
Parationmetílico	87,25±2,98
Óleo de nim	87,62±4,09
Extrato pirolenhoso	84,00±5,55
<i>P valor</i>	0,60

Valores expostos em média ± o desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade.

4.3.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

A exposição dos peixes aos diferentes agroquímicos/contaminantes não promoveram alterações morfológicas no tecido branquial (Figura 8). De modo geral, este tecido não apresentou as alterações buscadas e mostrou estrutura celular organizada, permanecendo dentro dos padrões normais de sobrevivência durante todo o período experimental.

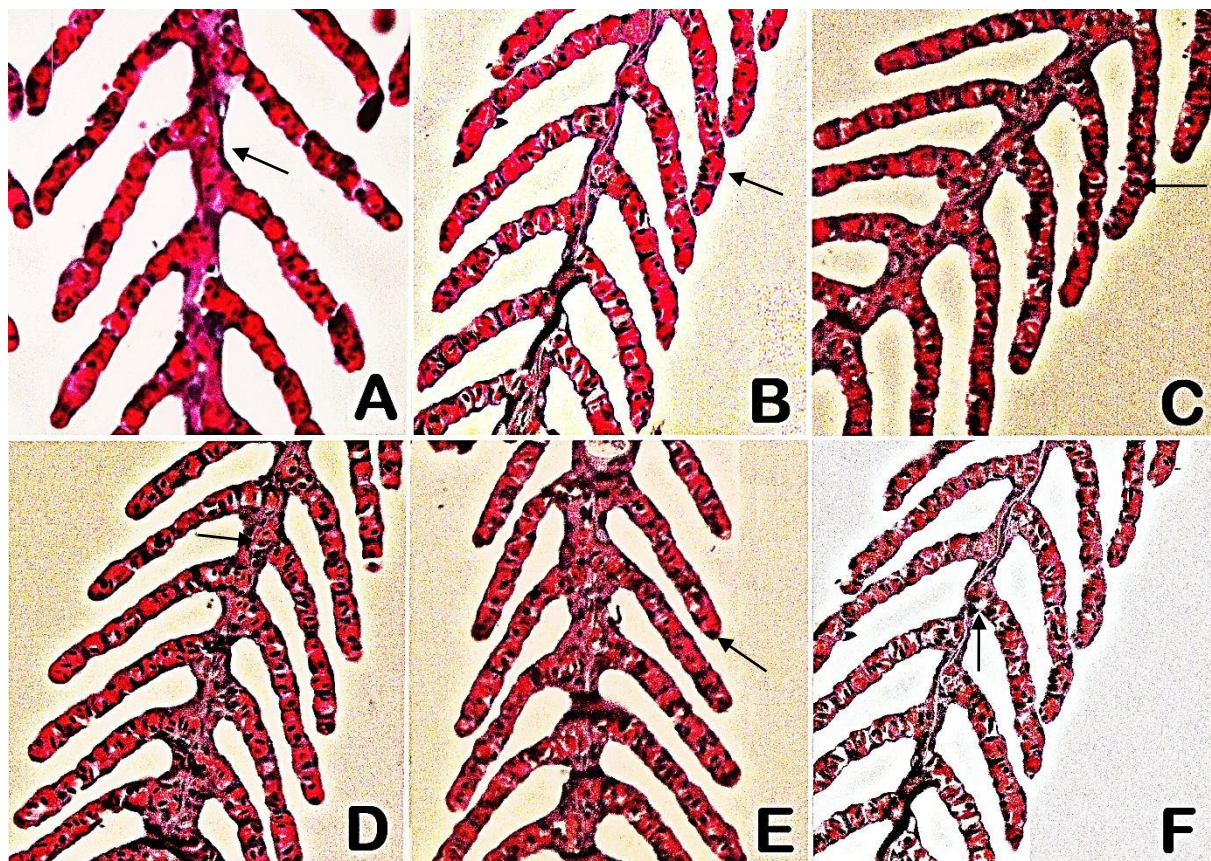


FIGURA 8. Tecido branquial de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes agroquímicos/contaminantes ao longo de 30 dias de criação. A e B – Controle. Observar lamelas primárias (A) e secundárias (B). C – Cipermetrina. Observar célula epitelial. D – Paration metílico. Observar célula de cloreto. E – Azadiractina. Observar célula pilar F – Extrato pirolenhoso. Observar célula mucosa. Microscopia de luz. Aumento: 40x. Corte: 5µm. Coloração: H.E

Da mesma forma, a exposição dos peixes aos diferentes agroquímicos/contaminantes não promoveram as alterações celulares buscadas no tecido hepático (Figura 9). Durante a coleta dos órgãos não foram observadas alterações morfológicas de coloração e tamanho. Nas avaliações, a morfologia do tecido caracterizou-se pela presença de hepatócitos em formatos irregulares, apresentando núcleos posicionados na região central e nucléolos evidentes. Além disso, foram observados capilares do tipo sinuzóide.

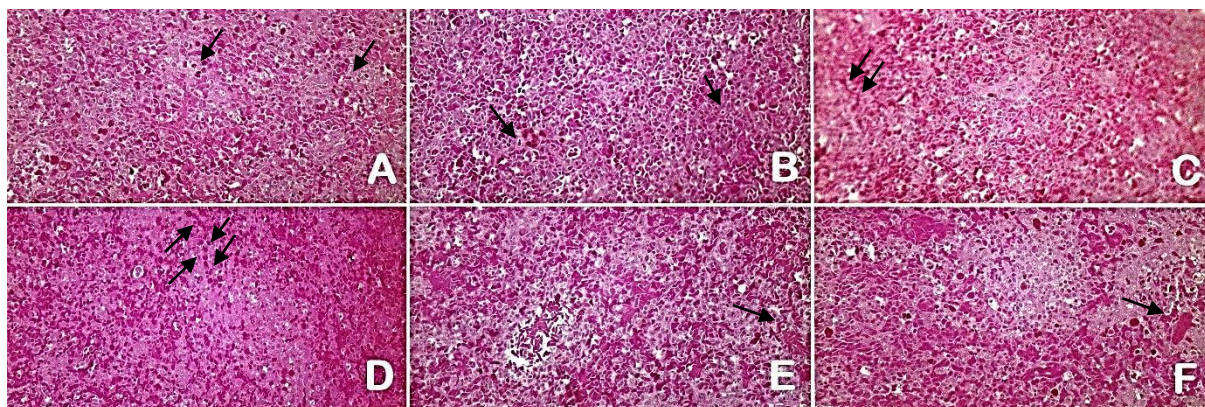


FIGURA 9. Tecido hepático de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes agroquímicos/contaminantes ao longo de 30 dias de criação. A e B – Controle. Observar hepatócitos. C – Cipermetrina. D – Paration metílico. E – Azadiractina. F – Extrato pirolenhoso. Microscopia de luz. (→) Capilares do tipo sinuzóide. Aumento: 10x. Corte: 5µm. Coloração: H.E

4.3.3 ELETROFORESE EM GEL DE CÉLULA ÚNICA (ENSAIO COMETA)

Os tratamentos contendo Cipermetrina e Paration metílico diferiram significativamente ($P < 0,05$) do controle (Figura 10), seguindo o escore proposto por Collins. (2004). Os demais tratamentos não influenciaram injúrias ao DNA de *Rhamdia quelen* ($P > 0,05$).

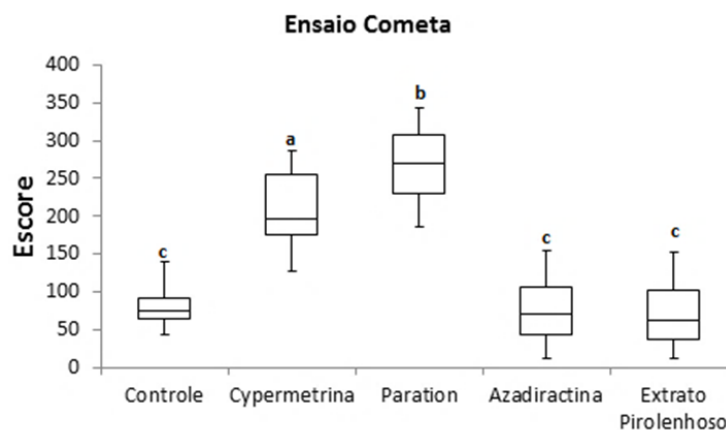


FIGURA 10. Escore de danos evidenciados no DNA em eritrócitos de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes agroquímicos e contaminantes ao longo de 30 dias de criação. Escore de danos determinado segundo Collins (2004). Letras diferentes indicam médias diferentes ($P < 0,05$), de acordo com o teste T.

4.3.4 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no músculo de *Rhamdia quelen* foi inibida ($P < 0,05$) somente pelo agroquímico paration metílico (Figura 11). Os demais contaminantes não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) do controle.

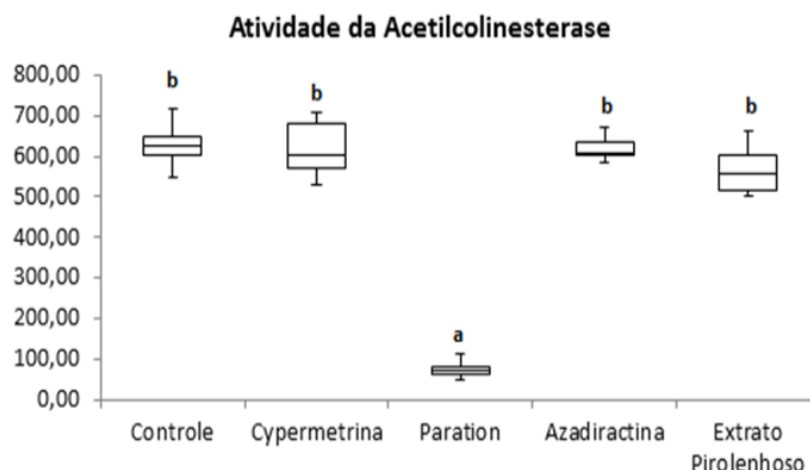


FIGURA 11. Atividade da enzima Acetilcolinesterase (AChE) no músculo de *Rhamdia quelen* expostos a diferentes agroquímicos/contaminantes ao longo de 30 dias de criação. Letras diferentes indicam médias diferentes ($P < 0,05$), de acordo o teste T.

5 DISCUSSÃO

Visto que a predação de larvas e alevinos de *Rhamdia quelen* por náíades de libélula é um empasse para o sucesso da larvicultura, determinar a dose mínima efetiva para o controle desses invertebrados significa grande importância econômica para o produtor. Possui também grande valor ambiental, havendo menor quantidade de produto na água, consequentemente, a contaminação do meio será reduzida.

O paration metílico apresentou efeito letal para as náíades de libélula nas doses entre 1000 e 5 $\mu\text{L/L}$ em tempos que variaram entre 30 a 450 minutos. Não existem estudos que indicam a concentração ideal deste produto para fins de controlar invertebrados aquáticos predadores de alevinos que possam ser comparados com esta pesquisa. Este composto pertence ao grupo dos organofosforados, que possuem toxicidade de nível I (extremamente tóxico), agem principalmente inibindo a enzima acetilcolinesterase, responsável pela quebra da acetilcolina, um importante neurotransmissor nas sinapses dos nervos colinérgicos e placas motoras, que em acúmulo no músculo ou no nervo causam paralisia e morte celular (GALLI et al., 2006).

A cipermetrina foi altamente tóxica para as náíades, sendo letal para os indivíduos em todas as doses testadas entre 1000 e 10 $\mu\text{L/L}$ em tempos que variaram de 30 a 600 minutos. A ação dos piretróides nos insetos é rápida, causa imediata paralisia e morte, este choque é ocasionado pelas alterações da funcionalidade dos canais de sódio

presentes nas membranas nervosas, este efeito é denominado *knock down* (SANTOS et al., 2007).

As náíades de libélula expostas a azadiractina em doses de 1000 a 20 µl/L apresentaram perda gradativa da capacidade de movimentação, culminando em um efeito estático. Tomazelli jr et al. (2011) testaram extratos etanólicos de sementes de cinamomo que contém azadiractina, na concentração de 0,375 mg/L e observaram lentidão nos movimentos. Os autores sugerem que estes resultados podem estar ligados ao fato da azadiractina inibir a síntese de quitina, que é responsável por manter a estrutura desses invertebrados.

O extrato pirolenhoso apresentou o mesmo efeito estático entre as concentrações de 1000 e 10 µl/L. Este produto possui mais de 200 compostos orgânicos que interagem sinergicamente e tem sido recomendado por agricultores como fertilizante, repelente e inseticida (BOGORNÍ et al., 2008). O autor ainda ressalta que embora a utilização dos extratos pirolenhos seja de grande interesse devido ao seu baixo custo e causar menor impacto ao meio, não existem dados de pesquisas que comprovem sua eficiência ou possíveis efeitos colaterais.

Com os testes de predação, foi possível verificar a alta predação das náíades de libélula em larvas de *Rhamdia quelen*. Na água sem contaminantes, as odonatas consumiram 93% das larvas de jundiá em um tempo de 90 minutos. Já nos tratamentos contendo paration metílico e cipermetrina o consumo foi de 27 e 13% respectivamente, números que se comparados com o controle, representam uma diminuição significativa na predação. Entretanto, em doses elevadas, os organofosforados e, principalmente os piretróides são tóxicos para peixes (SANTOS et al., 2007). Nos demais tratamentos, as náíades apresentaram efeito letárgico, onde perderam a capacidade de movimentação.

A azadiractina e o extrato pirolenhoso apresentaram uma redução do consumo em 57 e 74% respectivamente. Através dos testes, o extrato pirolenhoso demonstrou ser o menos eficaz para o controle das odonatas, entretanto, BOGORNÍ et al. (2008) levantam a hipótese de que extratos pirolenhos obtidos de diferentes espécies de madeira podem causar efeitos inseticidas distintos. Ainda, em seus testes, utilizou três diferentes extratos pirolenhos extraídos de *Eucalyptus grandis*, *Melia azedarach* e *Pinus caribaea* para controlar a alimentação e a ovoposição da traça do tomateiro, no entanto, não houve diferença significativa.

Durante a larvicultura, uma alta mortalidade dos animais experimentais foi observada, provavelmente este fator deve-se ao fato de que a densidade de estocagem

utilizada (2,9 larvas por litro) foi diferente do recomendado para a larvicultura de peixes nativos (0,3 larvas por litro) (PIAIA & BALDISSEROTTO, 2000).

As brânquias são extremamente importantes como indicadoras de histopatologias, pois são envolvidas em diversas funções como, trocas gasosas, osmorregulação, regulação ácido-base e de execução de compostos nitrogenados, é o primeiro órgão a entrar em contato direto com o estressor químico (EVANS et al., 2005).

Embora o fígado não seja o primeiro órgão a entrar em contato com o poluente, é considerado o principal órgão na biotransformação, portanto, um dos mais afetados por xenobióticos (FANTA et al. 2003). Normalmente, a exposição de larvas ou juvenis de peixes a organofosforados (FANTA et al., 2003) e piretróides (VELMURUGAN., et al 2007) causam danos em nível histológico nas brânquias e fígados (CENGIZ et al. 2006; KORKMAZ et al., 2009). Curiosamente, nas condições avaliadas não foram evidenciados indícios de possíveis patologias nestes órgãos, provavelmente, este fato deve-se as doses mínimas efetivas serem inferiores as doses testadas (FANTA et al., 2003; SANTOS et al., 2007) e as reposições de água nos aquários que foram feitas diariamente, diminuindo ainda mais a concentração destes produtos na água.

O paration metílico e a cipermetrina causaram danos ao DNA em eritrócitos de *R. quelen* nas condições avaliadas. NAGPURE et al., (2008) avaliaram a genotoxicidade de organofosforados em *Corydoras. punctatus* através do ensaio cometa, expondo os peixes a doses letais e subletais, resultando em alta toxicidade, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa. Alguns autores enfatizam que os organofosforados quebram as ligações de hidrogênio no DNA (SPEIT & HARTMANN, 1995; MASUDA et al. 2004) através da interação de seus metabólitos com as bases nitrogenadas e secundariamente, inibem a ação das enzimas de reparo através da interação com radicais de oxigênio podendo resultar em danos celulares irreversíveis.

Danos ao DNA de curimba *P. lineatus* expostos a concentrações agudas e subagudas de cipermetrina, foram evidenciados pelo ensaio cometa em eritrócitos (SIMONIELLO et al., 2009), e para hepatócitos de *D. rerio*, onde os danos ao DNA aumentam conforme a concentração do piretróide (JIN et al., 2011). A cipermetrina é hidrofóbica e de tamanho molecular reduzido, que permite a fácil permeabilidade nas membranas, atingindo o DNA no núcleo celular (SAXENA et al., 2005; HUSSEIN et al., 2013). Após permear o núcleo, a cipermetrina pode interagir diretamente com o

DNA, via polarização, desenrolando a dupla hélice, promovendo danos cromossômicos (SAXENA et al., 2005).

Ao avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase, responsável por hidrolisar a neurotransmissora acetilcolina, verificou-se que paration metílico foi o único tratamento que reduziu significativamente a atividade da enzima no músculo de *R. quelen*. Os inseticidas organofosforados atuam inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase, formando um complexo estável no sítio esterástico da enzima, impedindo a ação da acetilcolina neste complexo (LARINI, 1993). Estudos realizados por ABBAS & HAYTON (1997), em *O. mykiss* (truta arco-íris) afirmam que o paration metílico atua na inibição da acetilcolinesterase através da via de desulfuração oxidativa, formando o metabólito 20 paraxon. A inibição da acetilcolinesterase promove o acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas, podendo acarretar na morte do indivíduo. Embora não tenha sido observada inibição da acetilcolinesterase no músculo de *R. quelen*, é comumente relatada em peixes expostos a piretróides (MUSHIGERI & DAVID, 2005). Ainda, os autores ressaltam que a atividade da acetilcolinesterase é inibida no cérebro, brânquias, músculo e fígado da carpa indiana *C. mrigala* expostas ao fenvalerato em doses subagudas, por outro lado, REDDY et al. (1992) em *Cyprinus carpio* exposto a deltametrina, não apresentou redução da atividade da acetilcolinesterase no cérebro, músculo e fígado.

Com os resultados, é visto que o paration metílico é o mais eficaz no controle das náíades de libélula, entretanto o produto se mostrou tóxico ao *R. quelen* nas condições avaliadas. A cipermetrina reduz consideravelmente a predação, contudo, é importante ressaltar a sua toxicidade mesmo em doses subletais. O extrato pirolenhoso não inibiu a predação e de acordo com os testes, não possui toxicidade aos peixes. A azadiractina reduz a predação, sugerindo 43% de sobrevivência das larvas nas condições de avaliação e não possui ação tóxica para o jundiá.

Mesmo que a utilização da azadiractina nas condições avaliadas seja parcialmente eficaz no controle das náíades por ser uma alternativa natural à utilização de agroquímicos e não apresentar toxicidade aos animais, pesquisas complementares neste segmento devem ser realizadas para que sua utilização possa ser recomendada.

6 CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa demonstram a vulnerabilidade dos peixes aos poluentes no meio aquático, pois fazem contato íntimo com a água. Entre os produtos testados, o organofosforado paration metílico, mostrou-se o mais eficaz para o controle predatório das náíades de libélula, no entanto, é tóxico para os peixes nas condições avaliadas. A azadiractina reduziu a atividade predatória dos invertebrados e mostrou-se atóxica para os peixes, no entanto, novas pesquisas envolvendo este princípio ativo devem ser realizadas para que o mesmo possa ser recomendado para fins de controle de pragas aquáticas.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, Richat; HAYTON, William L. **A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for paraoxon in rainbow trout.** *Toxicology and applied pharmacology*, v. 145, n. 1, p. 192-201, 1997.
- ADAMES, M.S.; TOLEDO, C.P.R.; NEUMANN, G.; BUZZI, A.H.; BURATTO, C.N.; PIANA, P.A.; BOMBARDELLI, R.A. 2015 Optimization of the sperm:oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, 161(1): 119-128.
- BOGORNI, Paulo César et al. **Avaliação do efeito do ácido pirolenhoso de três espécies arbóreas sobre Tuta absoluta.** *Bioikos*, v. 22, n. 2, p. 109-115, 2008.
- CENGIZ, E. I.; UNLU, E. **Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study.** *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2006; 21: 246-253.
- COLLINS, A. R. **The Comet Assay for DNA Damage and Repair.** *Molecular Biotechnology*, v. 26, 2004.
- DE ANDRADE BRITO, Izabella et al. Modeling the exposure risk of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) to wastewater. **Ecological Modelling**, v. 347, p. 40-49, 2017.
- ELLMAN, George L. et al. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.
- EVANS, D.H.; PERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. **The multifunctional fish gill: dominant site of gas Exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste.** *Physiological Reviews*, v.85, p.97-177, 2005.
- FANTA, E., RIOS, F. S. A., ROMÃO, S., VIANNA, A. C. C., & FREIBERGER, S. (2003). **Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food.** *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(2), 119-130.

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014). **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO
- FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. **Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests**. Genetics and Molecular Biology, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.
- GALLI, Andressa et al. **Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos**. Química Nova, v. 29, n. 1, p. 105, 2006.
- HUSSIEN, H.M.; ABDOL, H.M.; YOUSEF, M.I. **Cypermethrin induced damage in genomic DNA and histopathological changes in brain and haematotoxicity in rats: the protective effect of sesame oil**. Brain Research Bulletin, v.92, o. 76-83, 2013.
- JIN, Y., et al. **Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Daniorerio*)**. Chemosphere, v.82, p. 398-404, 2011.
- KOAKOSKI, G., OLIVEIRA, T. A., DA ROSA, J. G. S., FAGUNDES, M., KREUTZ, L. C., & BARCELLOS, L. J. G. (2012). **Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages**. Physiology & behavior, 106(2), 129-132.
- KORKMAZ, N. et al. **Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid**. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 28, n. 2, p. 198-205, 2009.
- LARINI, L.; CARVALHO, D. de; LARINI, L. **Estimulantes centrais**. Larini, L. Toxicologia. São Paulo, Monele, v. 2, p. 251-256, 1993.
- MARCO Jr. P. et al. **Environmental determination of dragonfly assemblage in aquaculture ponds**. Aquaculture Research, Oxford, v.30, n.5, p.357-364, 1999.
- MASUDA, S., DEGUCHI, Y., MASUDA, Y., WATANABE, T., NUKAYA, H., TERAOKA, Y., TAKAMURA, T., WAKABAYASHI, K. & KINAE, N., 2004,

Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4- [bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3-dichloro-5,4-dinitro-biphenyl (ADDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the Comet Assay, *Mutat. Res.*, 560: 33–40. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.005>>.

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

MENEZES, José Roberto Rezende de; YANCEY, Dean Romain. **Manual de criação de peixes.** Campinas-SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1998. 117 p.

MEWES J.K.; MEURER, F.; TESSARO, L.; BUZZI, A.H.; SYPPERRECK, M.A.; BOMBARDELLI, R.A. 2016 **Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock.** *Aquaculture*, 465: 164–171.

MONTEIRO, D. A., RANTIN, F. T., & KALININ, A. L. (2009). **The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Bryconcephalus* () exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion).** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(1), 40-49.

MUSHIGERI, S.B.; DAVID, M. **Fenvalerate induced damages in the Ach and associated AChE activity in different tissues of fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) under lethal and sub-lethal exposure period.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.20, p. 65-72, 2005.

NAGPURE, A. D., KUMAR, S., KUMAR, R., & KUSHWAHA, B. (2008). **Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis.** *Chemosphere*, 71(10), 1823-1831.

PIAIA, Rosamari; BALDISSEROTTO, Bernardo. Densidade de estocagem e crescimento de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Ciência Rural*, v. 30, n. 3, 2000.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. D. S. F.; FERRARO, M. V. M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M. M. **Establishment of experimental**

- conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry.** Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 673, n. 1, p. 78-81, 2009.
- REDDY, P.M.; PHILIP, G.H. **Changes in the levels of respiration and ions in the tissues of freshwater fish, *Labeorohita* under fenvalerate stress.** Chemosphere, v.25, n.6, p.843-852, 1992.
- SANTIAGO-MOREIRA, M. R., MUCCI, J. L. N., CISCATO, C. H. P., MONTEIRO, S. H., & ABAKERLI, R. B. (2013). **Estudo do inseticida carbofurano em solo e sedimento de área de produção de arroz irrigado e controle do gorgulho aquático *Oryzophagusoryzae*, Taubaté, São Paulo, Brasil.** Arquivos do Instituto Biológico.
- SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. **Piretroides - uma visão geral.** Alimentos e Nutrição, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.
- SANTOS, N. D.; COSTA, J. M. & PUJOL-LUZ, J. R. 1988. **Nota sobre ocorrência de odonatos em tanques de piscicultura e o problema de predação de alevinos pelas larvas.** ActaLimnol.Brasil. 11: 771-780.
- SAXENA, K. K.; SETH, N. **Toxic effects of cypermethrin on certain hematological aspects of fresh water fish *Channa punctatus*.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 69, p. 364-369, 2002.
- SAXENA, P.N.; CHAUHAN, L.K.S.; GUPTA, S.K. **Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristematic cells of *Allium sativum*.** Spectroscopic basis of chromosome damage. Toxicology, v. 216, p. 244-252, 2005.
- SIMONIELLO, M. F. et al. **Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae).** Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 83, n. 2, p. 155-158, 2009.
- SOARES, C.M. et al. **Influência da disponibilidade de presas, contraste visual e do tamanho das larvas de *Pantala* sp. (Odonata, Insecta) sobre a predação de *Simocephalus serrulatus* (Cladocera, Crustacea).** Acta Scientiarum, Maringá, v.23, n.2, p. 357-362, 2001.

- SOUZA, L. O. I.; COSTA, J. M.; OLDRINI, B. B. **Odonata. Guia online:** Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo (CG Froehlich, ed.). Disponível em: <http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia_online> Acesso em...26/11/2016.
- SPEIT, Günter; HARTMANN, Andreas. **The comet assay (Single-Cell Gel Test) a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair.** DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems, p. 203-212, 1999.
- SPEIT, Günter; HARTMANN, Andreas. **The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay).** Mutagenesis, v. 10, n. 6, p. 555-560, 1995.
- TAVE, D. et al. **Effect of body color of *Oreochromismossambicus* (Peters) on predation by dragonfly nymphs.** Aquac.Fish.Manag. Oxford, v.21, n.2, p.157-161, 1990.
- TESSARO, L., TOLEDO, C.P.R., NEUMANN, G., KRAUSE, R.A., MEURER, F., NATALI, M.R.M., BOMBARDELLI, R.A. **Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase.** Aquaculture. 2012; 326:74–80
- TOMAZELLI JR, O. FRANCO, G. M. S., CASACA, J. M., MUNARINI, A. C., & DAL MAGRO, J. (2011). **Efeito do Extrato de Meliaazedarach sobre a predação de alevinos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) por larvas de *Neuraeschna* (Odonata: Aeshnidae).** Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, 15(1), 19-25.
- VELMURUGAN, Kamalakannan et al. **Mycobacterium tuberculosis nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells.** PLoSPathog, v. 3, n. 7, p. e110, 2007.
- VELMURUGAN,B.; SELVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E.I.; UNLU, E. **Histopathological changes in the gills and liver tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* exposed to dichlorvos.** Brazilian Archive Biology and Technology 2009, 52: 1291-1296.
- ZANIBONI FILHO, E. 2000. **Larvicultura de peixes de água doce.** Informe agropecuário. Belo Horizonte. 21(203): 69-77.