



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ZOOTECNIA**



**POTENCIAL TOXICOLÓGICO E O IMPACTO DO
PIRIPROXIFENO NOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus,
1758)**

Fábio Francisco da Silva

Zootecnista

RIO LARGO – ALAGOAS – BRASIL

Abril de 2017

FABIO FRANCISCO DA SILVA

**POTENCIAL TOXICOLÓGICO E O IMPACTO DO
PIRIPROXIFENO NOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus,
1758)**

Orientador: Prof. Dr. Emerson Carlos Soares e Silva

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Sônia Salgueiro Machado
Prof. Dr. Elton Lima Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Alagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

RIO LARGO – ALAGOAS – BRASIL

Abril de 2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586p

Silva, Fábio Francisco da.

Potencial toxicológico e o impacto do piriproxifeno nos parâmetros zootécnicos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) / Fábio Francisco da Silva. – 2017.

76 f. : il.

Orientador: Emerson Carlos Soares e Silva.

Coorientadores: Sonia S. Machado e Elton Lima Santos.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2017. |

Bibliografia: f. 63-76.

1. Tilápia do Nilo. 2. CL₅₀. 3. Piriproxifeno. 4. Toxicidade – Desempenho.
I. Título.

CDU: 639.312

TERMO DE APROVAÇÃO

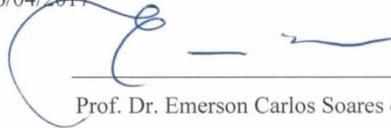
FÁBIO FRANCISCO DA SILVA

POTENCIAL TOXICOLÓGICO E O IMPACTO DO PIRIPROXIFENO NOS PARÂMETROS ZOOTECNICOS DE TILÁPIA DO NILO(OREOCHROMIS NILOTICUS, LINNAEUS,1758)

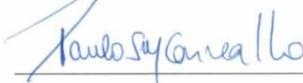
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 26/04/2017



Prof. Dr. Emerson Carlos Soares e Silva
Orientador (CECA/UFAL)



Prof. Dr. Paulo Sergio Martins de Carvalho
Membro (UFPE)



Prof. Dr. Sonia Salgueiro Machado
Membro (IQB/UFAL)

Rio Largo – AL

2017

Aos meus pais **Maria Tereza**, e **Jovino Francisco** (In memoriam), aos meus irmãos e sobrinhos (as). De modo todo especial, à minha **Mãe** que nunca mediu esforços para que eu continuasse, me fazendo acreditar que sonhar e torna-los reais só depende da nossa vontade.

DEDICO

Agradecimentos:

À Universidade Federal de Alagoas - UFAL;

Ao Centro de Ciências Agrárias - CECA, ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia - PPGZ, á minha coordenadora, e também Profª. Drª. Patrícia Mendes Guimarães Beelen, aos professores da pós-graduação e aos demais funcionários do PPGZ.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Emerson Carlos Soares e Silva, do qual participou de maneira direta na realização deste trabalho, me incentivando, me apoiando, me direcionando, de fato me orientando, e se preocupando tanto quanto eu, em cada detalhe para que desse tudo certo, e que também me deu pleno acesso ao Laboratório – LAQUA, juntamente com meu prof., amigo e Coorientador Prof. Dr. Elton Lima Santos, onde eu pude realizar meu/nosso trabalho e onde pude também enriquecer meus conhecimentos no que diz respeito ao ramo da pesquisa, obrigado também a Profª. Drª. Themis de Jesus, pelo cuidado para comigo e por sempre se preocupar com o andamento dos trabalhos, obrigado também ao Prof. Dr. Bruno Tenório pela disponibilidade e colaboração, a vocês o meu muito obrigado.

Aos meus amigos de laboratório, por me receberem tão bem, e por me ajudarem em todas as etapas do meu/nosso trabalho, Cristóvão Ferreira, Gabriela Santos, Joyce Lopes, Leôncio Jr. Lineker Alves, Mariza Marques, Roberta Maia, Wallace Oliveira, Walesson Cunha, Misleni Ricarte e Edvânia Pontes, a vocês o meu muito obrigado.

Quero agradecer também à minha amiga e Coorientadora, Profª. Drª Sônia Salgueiro Machado, pela paciência, disponibilidade, pelos ensinamentos, preocupação, acessibilidade, enfim, por tudo. Também deixo aqui meu agradecimento à Profª. Drª Jaqueline Maria da Silva pela paciência, ensinamentos e disponibilidade, aprendi muito com você, a Claudiane Marinho (Anne), Luan Batalha, Álvaro José, Kaline Toledo, Gabriel e Marcos Vinicius, a todos vocês do Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia - LBE, o meu muito obrigado.

Aos meus amigos de curso, Aila Fabiane, Aryane Paulino, Filipe Souza, Filipe Cavalcante, Elizabeth Amaral, Kleber Nunes, Luana Lira e Petrônio Melo; também aos meus amigos de profissão como, Daniel Torres, Monique de Carvalho, Rosivânia Melo, Sara Moura, Nebuzaradã Costa da Silva. Obrigado!

À Deus, meu agradecimento maior, pois sem Ele nada disso seria possível;

A todos vocês, a minha eterna gratidão!

RESUMO – A piscicultura é uma das atividades que mais cresce mundialmente com destaque para o cultivo de Tilápias em lagos e represas, sendo, portanto vulneráveis a exposição de produto químico lançado nestes corpos hídricos. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração letal 50% (CL₅₀-24 e 96h) de formulações comerciais do Piriproxifeno em distintas concentrações, bem como o impacto destas no desempenho zootécnico, comportamento locomotor, e ainda avaliar seu potencial toxicológico em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foi realizado teste de toxicidade aguda para determinação da CL₅₀-24 e 96h com 09 tratamentos em duplicata em 18 aquários de 20L. As CL₅₀-24 e 96h para alevinos de Tilápia foi de 10,70 mg/L e 2,77 mg/L, respectivamente. Teste de toxicidade crônica no período de 96h de exposição para quantificação da acetilcolinesterase, com 04 tratamentos em triplicata em 12 aquários de 20L, juntamente com as filmagens de vídeo rastreamento. Animais expostos às concentrações do Piriproxifeno no período de 96h não apresentaram alterações no seu comportamento locomotor. Animais expostos às distintas concentrações do Piriproxifeno ao longo das 96h apresentaram diferenças significativas, tanto na concentração proteica quanto na atividade específica da acetilcolinesterase cerebral. No teste de toxicidade subcrônica com duração de 28 dias de exposição, os animais submetidos às maiores concentrações apresentaram os piores desempenhos. O vídeo rastreamento demonstrou após 28 dias diminuição da atividade motora. Lesões mais severas no tecido hepático foram encontrados à concentração de 1,2 mg/L.

Palavras chave: CL₅₀, comportamento, desempenho, Piriproxifeno, Tilápia do Nilo, toxicidade

ABSTRACT – Fish farming is one of the world's fastest growing activities, with emphasis on the cultivation of Tilapia in lakes and dams, and therefore the exposure of the chemical released in these water bodies is vulnerable. The objective of this work was to determine the 50% lethal concentration (LC₅₀-24 and 96h) of commercial formulations of Pyriproxyfen in different concentrations, as well as their impact on zootechnical performance, locomotive behavior, and to assess their toxicological potential in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). An acute toxicity test was performed to determine LC₅₀-24 and 96h with 09 treatments in duplicate in 18 20L aquaria. The LC₅₀-24 and 96h for Tilapia fingerlings were 10.70 mg / L and 2.77 mg / L, respectively. Chronic toxicity test in the 96h exposure period for quantification of acetylcholinesterase with 04 treatments in triplicate in 12 20L aquaria along with video filming. Animals exposed to the concentrations of Piriproxifene in the period of 96h did not present alterations in their locomotive behavior. Animals exposed to different concentrations of Piriproxifene over the 96 hours presented significant differences in both protein concentration and specific activity of cerebral acetylcholinesterase. In the subchronic toxicity test with duration of 28 days of exposure, the animals submitted to the highest concentrations presented the worst performances. The video tracking demonstrated after 28 days decreased motor activity. More severe lesions in hepatic tissue were found at a concentration of 1.2 mg / L.

Key words: LC₅₀, behavior, performance, pyriproxyfen, Nile tilapia, toxicity

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ATCh	Acetiltiocolina
AChE	Acetilcolinesterase
BuChE	Butirilcolinesterase
BTCh	Butiriltiocolina
BCh	Butirilcolina
ChE	Colinesterase
CL	Concentração letal
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
PPF	Piriproxifeno
SNC	Sistema nervoso central

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Figura 2. Sinapse colinérgica no Sistema Nervoso Central (SNC)

Figura 3. Inibição da AChE e a dessensibilização dos receptores de ACh

Figura 4. Estrutura molecular do PPF

Figura 5. Biometria inicial e transferência para os aquários experimentais

Figura 6. Determinação da CL₅₀ e percentual de mortalidade de exemplares de alevinos de Tilápia do Nilo no período de exposição de 24 e 96h

Figura 7. Montagem do experimento toxicidade crônica

Figura 8. Extração do cérebro de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*)

Figura 9. Procedimento de preparo do homogenato de células para leitura em espectrofotômetro

Figura 10. Análise do Comportamento Locomotor (Vídeo rastreamento)

Figura 11. Concentração de proteína no extrato cerebral de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta a distintas concentrações de PPF por 96h

Figura 12. Atividade específica da acetilcolinesterase no cérebro de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta a distintas concentrações de formulações comerciais de PPF por 96h

Figura 13. Análise do Comportamento Locomotor (Vídeo rastreamento)

Figura 14. Fotomicrografias do fígado de Tilápias do grupo controle (A e B)

Figura 15. Fotomicrografia do fígado de Tilápias expostas às distintas concentrações do PPF

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da toxicidade dos agrotóxicos

Tabela 2. Principais categorias de agrotóxicos quanto à sua ação e ao grupo químico ao qual pertencem

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água em diferentes concentrações do PPF no ensaio de toxicidade aguda

Tabela 4. Média de mortalidade de *O. niloticus* em concentrações crescentes de PPF no teste de toxicidade aguda aos períodos de exposição de 24 e 96h

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos da água de diferentes concentrações do Piriproxifeno no ensaio de toxicidade crônica de 96h

Tabela 6. Análise do comportamento locomotor de Tilápia do Nilo no período de exposição de 4h

Tabela 7. Análise do comportamento locomotor de Tilápia do Nilo no período de exposição de 96 h

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos da água de diferentes concentrações do Piriproxifeno no ensaio de toxicidade subcrônico de 28 dias

Tabela 9. Desempenho de alevinos de Tilápia do Nilo submetidos a diferentes concentrações do PPF

Tabela 10. Análise do comportamento locomotor de Tilápia do Nilo no período de exposição de 28 dias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Cenário atual da produção de pescado.....	15
2.1.1. A espécie <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758).....	18
2.1.2. Taxonomia da espécie	18
2.2. Contaminação em ambientes aquáticos e seu impacto na piscicultura.....	20
2.2.1. Ecotoxicologia e o uso de biomarcadores enzimáticos como ferramentas na piscicultura	21
2.3. Qualidade de água	23
2.3.1 Variáveis da qualidade da água	24
2.4. Agrotóxicos no meio ambiente	25
2.4.1. Toxicologia	26
2.4.2. Toxicidade de acordo com o período de exposição	27
2.4.3. Toxicologia dos agrotóxicos	27
2.5. Organofosforados e carbamatos	30
2.5.1. Organoclorados.....	32
2.5.2. Piretróides	32
2.5.3. Herbicidas	33
2.5.4. Piriproxifeno (PPF)	33
3. MATERIAL E METODOS	36
3.1. Caracterização do Local de Estudo.....	36
3.2. Implantação do estudo	36
3.3. Teste de toxicidade aguda	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Qualidade de água.....	38
5. CONCLUSÃO	41
3.3.1 Teste de toxicidade crônica	41
3.3.2. Preparação do extrato cerebral	42
3.3.3. Determinação de Atividade da Enzima ChEs	43
3.3.4. Quantificação de Proteína	44
3.3.5. Análise do Comportamento Locomotor (Vídeo rastreamento)	44

4. RESULTADOS	46
4.1. Qualidade de água	46
4.2. Análise do comportamento locomotor	46
4.3. Análise de biomarcadores enzimáticos	47
5. DISCUSSÃO	49
5.1. Análise do comportamento locomotor	49
5.2. Análise de biomarcadores enzimáticos	50
6. CONCLUSÃO	50
3.3.2. Teste de toxicidade subcrônica	51
3.3.3. Análise do comportamento locomotor (vídeo rastreamento).....	52
3.3.4. Análise histopatológica.....	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Qualidade de água.....	54
4.2. Análise do comportamento locomotor.....	55
4.3. Análise histopatológica.....	55
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura é uma das atividades produtivas que mais se desenvolve devido às características particulares que torna essa atividade próspera e sustentável. A região Nordeste do Brasil se destaca por apresentar inúmeras espécies com potencial considerável e adaptadas ao ambiente tropical (SANTOS et al., 2013).

Essa atividade é representada em 83% pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e pelo grupo dos peixes redondos, em que se incluem o Tambaqui, Tambacu, Pacu e Tambatinga. Somente as Tilápias contribuem com 47% da produção nacional (IBGE, 2015).

A Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) é uma espécie de peixe bastante versátil na piscicultura, pois se adapta a qualquer tipo de manejo, sem nenhuma limitação à tecnologia imposta a ser empregada. É uma das espécies mais promissora para a piscicultura, apresenta bom desempenho e retorno econômico quando submetidas a manejos intensivos, além de possuir carne com boas características organolépticas e filé sem espinhos intramusculares em forma de “Y”, proporcionando assim, cortes nobres com uma excelente aceitação por parte do mercado consumidor (MEURER et al., 2005). Destaca-se também por sua rusticidade e rápido crescimento.

As Tilápias são animais que estão presentes em todos os ambientes de água doce, e com isso está vulnerável a exposição de contaminantes. A fonte dessa contaminação é bastante variável, vão desde efluentes industriais, mecanismos de drenagem agrícola (fertilizantes), casos acidentais ou não (lixos químicos) a lixos domiciliares que podem ser carreados para os rios e mares, causando a contaminação dos ecossistemas aquáticos, comprometendo a vida dos animais que ali vivem (AKAISHI, 2004).

De modo geral, os ambientes aquáticos são usados em todo o mundo para diferentes finalidades, entre as quais se destacam o abastecimento de água, geração de energia, irrigação para cultivos de lavouras, navegação e aqüicultura. É um dos ecossistemas que mais sofre impactos causados pela

ação antrópica, uma vez que constitui as repartições finais de diversos produtos gerados pela atividade humana (AKAISHI, 2003).

Os peixes formam um grupo de grande importância em estudos de avaliações de toxicidade ambiental, além de estarem presentes em diversos ambientes, apresentam ainda uma ampla distribuição geográfica participando de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, com isso, são considerados ótimos modelos biológicos de estudo, sendo usados inclusive como indicadores de qualidade ambiental (SOUZA et al., 2016).

A princípio, a contaminação nestes ambientes pelo o uso indiscriminado dessas substâncias tóxicas pode passar despercebida devido ao fato de muitos desses xenobióticos permanecerem em níveis subletais no ambiente por curtos períodos e também por serem pouco analisados por não causarem de imediato a morte nos peixes (FANTA, 2003). Entretanto, a contaminação subletal pode alterar significativamente vários processos, como por exemplo, processos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos ao entrarem em contato com órgãos dos organismos aquáticos não alvo (LINS, 2010).

Existem centenas de poluentes que trazem danos aos organismos aquáticos, à compreensão criteriosa desses danos ou efeitos sobre os corpos d'água é de extrema importância para o controle da poluição nos ecossistemas (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). Destaca-se assim o Piriproxifeno, pois é um larvicida amplamente utilizado na água para o combate ao mosquito transmissor da dengue a seres humanos, além de ser altamente tóxico a organismos aquáticos.

Ante ao exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da neurotoxicologia aguda, crônica e subcrônica, de formulações comerciais do Piriproxifeno no desempenho e comportamento de *O. niloticus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cenário atual da produção de pescado

Nas últimas décadas, a demanda mundial por pescado tem sofrido um significativo aumento, principalmente em função do crescimento populacional e

de modo particular a busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis. Por tanto, a aquicultura aparece como a alternativa mais propícia para continuar aumentando a oferta nos próximos anos, tendo em vista que a pesca já se encontra com sua produção estabilizada desde a década de 1990 (FAO, 2014a).

Dentre os países com maior potencial para a aquicultura, o Brasil tem papel de destaque, em especial por sua disponibilidade hídrica, clima favorável e ocorrência natural de outras espécies aquáticas que compartilham interesse tanto zootécnico quanto mercadológico (BRASIL, 2013a). No entanto, a produção aquícola nacional ainda apresenta números incipientes quando comparada a dos maiores produtores do mundo, como a China, a Índia, o Vietnã e a Indonésia (FAO, 2014b).

Dentro da aquicultura brasileira, a piscicultura continental, a carcinicultura marinha e a malacocultura são os ramos mais desenvolvidos, isso se baseia especialmente nas espécies exóticas, sendo praticado em inúmeros ambientes modalidades e métodos de produção. A carcinicultura de água doce, a ranicultura, a algicultura e a quelonicultura também contam com investimentos comerciais, apesar de ter números de iniciativas reduzidas (BRASIL, 2013b).

Segundo Babo (2014), alguns estados apresentam produções em estágios mais elevados no que diz respeito à estruturação, são autossustentáveis em relação aos insumos básicos e com capacidade de beneficiamento, enquanto outros são menos competitivos e necessitam de maiores incentivos. O estado do Pará, por exemplo, se encaixa no segundo grupo, mesmo apresentando condições naturais favoráveis para o desenvolvimento das mais variadas espécies aquícolas.

Sabe-se que o pescado é fonte de proteína de alto valor biológico, vitaminas, ácidos graxos insaturados, apresenta baixo teor de colesterol, dando ao consumidor uma opção mais saudável em relação às demais carnes (GONÇALVES, 2011). Estima-se que o pescado tenha uma representatividade de 16,7% de toda a proteína animal consumida pelos humanos no planeta e 6,5% de toda a proteína, levando em consideração tanto a proteína de origem

animal quanto a de origem vegetal. Tais valores são maiores aos das carnes de suíno, frango, bovino, ovinos e caprinos, na sequência as mais consumidas (FAO, 2014a; FAO, 2014b).

As principais espécies produzidas pela aquicultura foram: carpa-capim *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes, 1844), carpa-prateada *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844), carpa-comum *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), o molusco bivalve almeijoa-japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) e a Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (FAO, 2014b). Lembrando que esta espécie encontra-se presente em cerca de 100 países, apresentando participação nos mais variados mercados sendo que neste século, deve ser a espécie mais significativa da piscicultura comercial (FITZSIMMONS, 2000).

Em relação à aquicultura continental, a produção nacional em 2011 foi de 544,4 mil toneladas, sendo baseada especialmente na criação de peixes, uma vez que os outros ramos praticados em água doce não apresentaram algarismos significativos. Tiveram as maiores produções, as regiões Sul, Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste. A Tilápia, o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), o híbrido tambacu (♀ *Colossoma macropomum* x ♂ *Piaractus mesopotamicus*), a carpa-comum e o pacu-caranha *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) foram as principais espécies cultivadas, (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013b).

A piscicultura continental teve sua representatividade especialmente pelo cultivo de Tilápias em tanques-rede nos açudes do Ceará e nos reservatórios do rio São Francisco, em áreas como, Bahia, Pernambuco e Alagoas, e pelos peixes redondos em viveiros escavados no estado do Maranhão, Piauí, Sergipe e Bahia. As principais sedes da região foram o Lago de Itaparica nos estados da Bahia e de Pernambuco e os açudes do Castanhão, de Orós e de Sítios Novos no Ceará. Levando-se em consideração que os canais de comercialização mais significativos foram os atacadistas, venda direta e os supermercados (KUBITZA et al., 2012a; KUBITZA et al., 2012b; BRASIL, 2013a; BRASIL, 2013b).

2.1.1. A espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

A *Oreochromis niloticus* (Linnaeus,1758) (**Figura 1**), é uma espécie originária da África. Esta família é encontrada em ambientes de água doce na África, Ásia, América do Sul e Central, por tanto, está presente praticamente em todo o mundo devido ao seu cultivo na aquicultura. Tilápia, é o nome dado a diversos gêneros de peixes que pertencem à sub-família Pseudocrenilabrinae (MARTINS, 2008; RODRÍGUEZ-FUENTES; GOLD-BOUCHOT, 2004).

2.1.2. Taxonomia da espécie

Filo: Chordata

SubFilo: Vertebrata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Osteichthyes

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Espécie: *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo)

Figura 1. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus,1758)



Foto: GUSMÃO, L., 2017.

Em 1971, a Tilápia do Nilo foi introduzida no nordeste brasileiro, e posteriormente foi difundida pelo resto de país (BOSCOLO et al., 2001). É uma espécie que constroem seus ninhos, e seus ovos quando fertilizados, são incubados na boca. Pode ser ligeiramente identificadas por uma interrupção na linha lateral o que caracteriza a família Cichlidae.

Segundo Santos (2004), o corpo das Tilápias é lateralmente comprimido e com longa nadadeira dorsal, onde a parte anterior é pronunciada e espinhada, espinhos também são encontrados nas nadadeiras pélvicas e anal. A Tilápia é uma espécie não nativa que pode trazer influência no ambiente ao qual foi introduzida, podendo causar um desequilíbrio local, como por exemplo, predação, competição por espaço com as espécies nativas e competição por alimento (CARVALHO, 2008).

De acordo com Brasil (2000), a esta espécie apresenta diversas características desejáveis:

- Alimenta-se dos níveis primários da cadeia trófica;
- Aceita grande variedade de alimentos;
- Eficiência na ingestão de proteínas de origem animal e vegetal;
- Resistente à doença, ao superpovoamento e aos reduzidos níveis de oxigênio dissolvido;
- Desova durante todo o ano nas regiões mais quentes do país;
- O seu cultivo gera, em média, três empregos por hectare de lâmina de água cultivada, levando em consideração os empregos gerados na propriedade, na extensão rural, na indústria de equipamentos, de insumos e de processamento e na distribuição do pescado, dentre outros setores da cadeia produtiva piscícola;
- Peixe bem aceito no mercado consumidor brasileiro e com forte demanda internacional.

Em relação às espécies carnívoras, a Tilápia se coloca em vantagem por ser um peixe de baixo nível trófico, por ser onívoro e finalmente por requerer menor quantidade de farinha de peixe nas rações (FITZSIMMONS, 2000). Por apresentar tal particularidade, apresenta capacidade em utilizar uma ampla variedade de alimentos (SKLAN et al., 2004).

Atualmente, os produtos oriundos da aquicultura tem sido uma importante fonte de proteína animal para um numero de pessoas que vem crescendo em todo mundo, levando-se em consideração que maior parte desta demanda é atendida pela aquicultura comercial (FIGUEIREDO; LEAL, 2008). O principal

causador da crescente demanda de pescado é a mudança de hábito alimentar por parte da população para o consumo de carnes brancas, sendo estes dados aliados à estabilidade em relação ao número de captura da pesca marítima (HERMES, 2009).

2.2. Contaminação em ambientes aquáticos e seu impacto na piscicultura

O grande potencial hídrico brasileiro torna a aquicultura uma atividade econômica em expansão, sobretudo na região nordeste, cujo clima é propício para uma produtividade continuada ao longo do ano. Além disso, o maior índice de crescimento populacional e a conseqüente demanda por alimento demanda uma produção ainda maior. O nordeste, devido à disponibilidade de áreas propícias à implantação dessa atividade, é um polo em potencial para o desenvolvimento piscícola. Todavia os ambientes aquáticos estão suscetíveis a substâncias químicas, sendo essa suscetibilidade dependente das propriedades físicas e químicas dos contaminantes e dos produtos resultantes de sua transformação; da concentração desses xenobióticos no ecossistema, da sua duração no mesmo e do tipo de descarga desses contaminantes (MOZET; ZAGATTO, 2006).

Perdas de nutrientes do solo para corpos d'água por alterações no uso da terra (JIN et al., 2005), contribuem cada vez mais para a eutrofização dos ambientes aquáticos, com isso à perda significativa da qualidade de água, ocasionando danos ao homem e a biodiversidade aquática, interferindo na composição das espécies, contribuindo para uma possível dominância de espécies invasoras, ou seja, reduzindo a diversidade dos ecossistemas aquáticos continentais (RICHARDSON, 2010).

Os efluentes de aquicultura são ricos em nitrogênio, fósforo e matéria orgânica, também contribuem para o processo de eutrofização dos rios, com isso, para minimizar esses impactos devem-se formular dietas com maior digestibilidade e com menor quantidade de nutrientes e efetivar o manejo adequado das criações. Além disso, há a necessidade do tratamento dos efluentes visando atender a exigência das novas legislações e as pressões de órgãos ambientais e da própria sociedade.

A expansão agrícola no Brasil foi caracterizada por falta de planejamento e consequente destruição dos recursos naturais. Somente na última década houve um aumento de 190% no mercado interno do uso de pesticidas, fazendo do país um recorde mundial no consumo desses produtos (SINDAG, 2009). Entre o ano de 2010 e 2011, aproximadamente 940 toneladas de pesticidas foram utilizados em todo território nacional (ANVISA, 2012). Diante disso faz-se necessário a identificação destes contaminantes como também avaliar seu potencial toxicológico por meio de organismos aquáticos.

Os agrotóxicos, contaminantes aquáticos de alto grau, causam vários malefícios à biota aquática e consequentemente aos seres humanos quando utilizam destes como alimentos. De modo geral, poluição ambiental provocada pelo o uso de pesticidas, principalmente nos ecossistemas aquáticos tem sido registrada em todo o mundo e representa um grande problema, tanto a nível local quanto global (CEREJEIRA et al., 2003; SPALDING et al., 2003).

2.2.1. Ecotoxicologia e o uso de biomarcadores enzimáticos como ferramentas na piscicultura

Um diagnóstico precoce de contaminação por agrotóxico pode minimizar danos maiores à saúde animal, principalmente quando para este diagnóstico foi utilizado parâmetros biológicos com a finalidade de estudar a exposição às substâncias químicas para estimar o risco dos organismos expostos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), os biomarcadores compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade de exposição e o risco à saúde. E estes podem ser classificados em três classes: de exposição, de efeito e de suscetibilidade (FREIRE et al., 2008). Os biomarcadores, por definição, consistem em uma variedade de respostas biológicas relacionadas à exposição a contaminantes que podem incluir uma resposta molecular, celular, fisiológico ou comportamental (MONTSERRAT et al., 2003).

Os peixes compõem diversos grupos que são representados por uma grande variedade que se refere ao seu ciclo de vida, reprodução, hábitos

alimentares, entre outros, esses animais têm algumas particularidades em relação às respostas ambientais as quais os mesmos são submetidos. Diante disso o estudo e o entendimento da fisiologia desses animais se torna importantíssima para a piscicultura, com isso, pode-se entender tanto do funcionamento das diferentes espécies submetidas a diferentes condições ambientais como também delimitar melhores condições de cultivo para os mesmos (BALDISSEROTTO, 2002).

A contaminação dos ecossistemas aquáticos ocasionou na necessidade de entender e avaliar os efeitos biológicos de poluentes sobre a vida aquática. Com isso, um vasto número dos estudos utilizou o emprego de distintos biomarcadores como ferramentas para avaliar a toxicidade de determinadas substâncias para populações naturais, (VAN DER OOST et al., 2003; ALPUCHE-GUAL; GOLD-BOUCHOT, 2008; RODRIGUES et al., 2011).

Para Van Der Oost et al., (2003) biomarcadores representam alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamental podendo alterar a homeostase de um determinado organismo. A avaliação de biomarcadores nos níveis molecular e celular foi proposta como marcas precoces de exposição à poluição química, de modo a ser uma ferramenta sensível e confiável na avaliação de qualidade ambiental (VAN DER OOST et al., 2003). Entre os biomarcadores mais empregados incluem a inibição da acetilcolinesterase (AChE) e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo que envolvem a quantificação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase.

Avaliando-se que biomarcadores utilizados de forma isolados possam não retratar de forma ampla o comprometimento da saúde do organismo, recomenda-se a utilização de uma série de biomarcadores para determinar o impacto fisiológico dos poluentes químicos. Assim sendo, o uso de diversos biomarcadores contribuirá para elucidar o mecanismo do agente poluente (FLAMMARION et al., 2002).

As enzimas do estresse oxidativo, representadas pela catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e peroxidase, são de extrema importância para a manutenção da vida por estarem ligadas ao processo de

proteção contra espécies reativas de oxigênio, e são consideradas importantes ao viabilizar a sobrevivência de organismos em ambientes contaminados.

O estresse pode ser detectado ou como uma resposta do próprio organismo, como também aos tecidos e células. O estresse oxidativo, por exemplo, se dá em função da formação de espécies reativas de oxigênio que são chamadas de EROs. Essas espécies se tornam nocivas ao organismo (HERMES-LIMA et al., 2001).

2.3. Qualidade de água

A Organização das Nações Unidas (ONU) considera a pesca e a aquicultura como atividades estratégicas para a segurança alimentar sustentável do planeta, onde são capazes de ofertar alimento proteico de boa qualidade como também gerar empregos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (ARANA, 2007). Nesse contexto Tundisi (2005) relata que os reservatórios artificiais têm sido utilizados para diversas finalidades, entre elas a produção de alimento através da piscicultura. Nesse caso, a gestão e o monitoramento da qualidade hídrica dos reservatórios se tornam necessários para os usos diversos (ECHANIZ; VIGNATTI, 2009).

O sistema de criação de peixes em tanques-rede é uma categoria de criação intensiva, onde se utiliza uma alta densidade de estocagem e, conseqüentemente, requer constante renovação de água para a dispersão dos resíduos metabólicos dos peixes no meio ambiente. Sabe-se que estes resíduos maximizam, principalmente, os níveis de nitrogênio e fósforo na água (GUO; LI, 2003; GUARINO et al., 2005; GUO et al., 2009), levando a um processo que chamamos de eutrofização artificial (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008), que leva a deterioração da qualidade da água, inviabilizando a atividade; influenciando no desempenho produtivo dos peixes (BACCARIN; CAMARGO, 2004), uma vez que estes animais vivem em equilíbrio com o meio aquático e qualquer modificação na qualidade da água pode resultar em uma minimização de crescimento e/ou morte.

Outro fator importante é o fato da piscicultura ser uma atividade potencialmente poluidora, o que traz preocupações. Porém, resultados

mostram que essa atividade pode ser praticada com sustentabilidade desde que alguns cuidados são considerados, principalmente respeitando os limites da capacidade de suporte (DIEMER et al., 2010).

Na atividade piscícola em tanques-rede é importante avaliar a qualidade da água do local onde se deseja produzir, pois na maioria dos casos é inviável a correção devido aos grandes corpos d'água (ONO, 2005). Os parâmetros da qualidade de água são: temperatura, oxigênio, pH, transparência e etc.

2.3.1 Variáveis da qualidade da água

Temperatura: é um dos fatores mais importantes nos fenômenos químicos e biológicos existentes em um viveiro, as atividades fisiológicas dos peixes, como, respiração, digestão, reprodução, alimentação, etc., estão estreitamente relacionadas à temperatura da água. Os peixes regulam sua temperatura corporal de acordo com a temperatura ambiente. Cada espécie tem uma temperatura específica na qual melhor se adapta e se desenvolve, sendo essa temperatura denominada de temperatura ótima. Temperaturas acima ou abaixo do ótimo interferem de forma negativa no seu crescimento, podendo ocorrer mortalidades em casos de temperaturas extremas.

pH: o pH é determinado através de concentrações de bases e ácidos na água. Os peixes sobrevivem e desenvolvem-se melhor em água com pH entre 6 – 9, valores fora dessa faixa, seu crescimento será afetado, principalmente em espécies que apresentam dificuldades em estabelecer o equilíbrio osmótico ao nível das brânquias, o que estabelece dificuldades respiratórias. Fatores como, respiração, fotossíntese, adubação, calagem e poluição causam mudanças de pH na água.

Oxigênio dissolvido: é o gás mais importante para os peixes, ou seja, devemos dar maior ênfase. Existem duas formas de obtenção de oxigênio: difusão direta e processo de fotossíntese.

Condutividade elétrica: oferece importantes informações sobre o metabolismo do viveiro, auxiliando na detecção de fontes poluidoras. Quando apresenta valores altos, indicam grau de decomposição elevado e o inverso indica acentuada produção primária como, algas e microrganismos aquáticos,

sendo, portanto, uma ferramenta na avaliação da disponibilidade de nutrientes no meio aquático. O valor aceitável de condutividade elétrica na piscicultura está entre 0,02 a 0,1 μ .S/cm.

Transparência: é um indicador estreitamente relacionado à produção primária. Quando a água de um viveiro é transparente permite que se veja o fundo do mesmo, sendo assim, um deserto de produção biológica assimilável, conseqüentemente, faltará alimento natural para o desenvolvimento dos peixes. Por outro lado, a transparência ou turvação da água dos viveiros impede a penetração da luz solar na coluna d'água, sendo a mesma, uma fonte de energia fundamental para os vegetais clorofilados (algas), que são produtores de substâncias orgânicas, através do processo de fotossíntese.

Quanto à utilização de água na aquicultura, recomenda-se aos criadores que preconizem normas quanto a sua obtenção, uso e reuso a sua disposição e que deem importância à aplicação de meios de avaliação e recuperação simples e diretos.

2.4. Agrotóxicos no meio ambiente

O uso de grandes quantidades de pesticidas, inseticidas e herbicidas vem despertando o interesse de órgãos governamentais e cresceu a necessidade de um melhor entendimento e avaliação dos efeitos biológicos de xenobióticos na biota aquática. De modo que aumentou o número de pesquisas em busca de novas técnicas de monitoramento de contaminantes de solos e recursos hídricos utilizando biomarcadores.

A contaminação dos rios, represas e açudes com agrotóxicos utilizados na agricultura quase sempre ocorre devido ao carreamento pelas águas das chuvas, águas de irrigação ou erosão das partículas de solos tratados. Os pesticidas organofosforados, carbamatos e os piretroides estão entre os que são considerados mais tóxicos e são neurotóxicos, (WANG, 2003; KUMAR, et al., 2009).

Na agricultura atual, os agrotóxicos são considerados indispensáveis, e tidos também como os principais causadores de poluição ambiental do planeta (GRISOLIA, 2005). Na última década esse mercado cresceu rapidamente,

levando o Brasil à posição de maior consumidor mundial desses defensivos desde 2008 (LONDRES, 2011; RIGOTTO, 2014).

Segundo Grazziero (2015), a frequência na utilização dos agrotóxicos é maior do que a média observada nos países de altas latitudes devido ao clima e em função dos métodos que são empregados na agricultura. Deve-se levar em consideração que mesmo que, seu emprego seja útil e indispensável para a agricultura, seu amplo emprego tem trazido consequências ao meio ambiente (UˆGURLU, 2015).

No Brasil, essas substâncias utilizadas são classificadas de acordo com sua finalidade, sendo denominados através de seu mecanismo de ação no alvo biológico, como por exemplo, plantas daninhas, doenças e pragas agrícolas de espécies cultivadas. Nesse contexto de mercado, têm-se, os herbicidas (48%), inseticidas (25%) e fungicidas (22%), onde os mesmos movimentam em média 95% do consumo mundial (AGROW, 2007).

Os peixes são animais vulneráveis a impactos ambientais, como por exemplo, resíduos industriais, derramamento de óleo, pesticidas, herbicidas e etc. Locais de cultivo de peixes e outros organismos aquáticos estão com frequência sendo exposto à água contaminada, isso se dá ao fato de que, esses locais estão próximos aos campos que são utilizados para cultivo de vegetais que são tratados com esses defensivos.

Esses contaminantes podem chegar aos rios por vias aéreas, que alcançam aos corpos d'água por deposição atmosférica e por contaminantes terrestres que chegam até os ambientes aquáticos através do escoamento pelas chuvas (DOMINGOS, 2006). Visto que a vida aquática está frequentemente exposta a essa diversidade de substâncias tóxicas (AKAISHI, 2004).

2.4.1. Toxicologia

É a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de xenobióticos com o organismo, com o objetivo de prevenir, diagnosticar e tratar as intoxicações causadas. A toxicologia engloba uma ampla área do

conhecimento que possibilita a atuação de diversas áreas profissionais (CHASIN; LIMA, 2010).

Os fatores que exercem influência sobre a toxicidade de uma substância são a frequência de exposição, período de exposição e via de administração do princípio ativo. Com isso, deve-se conhecer qual efeito ele traz qual a dose para causar tal efeito, informações sobre as propriedades da substância e informações sobre o período de exposição e do indivíduo, (LEITE; AMORIM, 2003).

2.4.2. Toxicidade de acordo com o período de exposição

Toxicidade Aguda: decorrente de um único contato (dose única/relacionado à eficiência da substância) ou vários contatos (efeitos cumulativos) com substância tóxica, em um período de exposição de aproximadamente 24 horas. Os efeitos surgem de imediato ou ao longo de alguns dias, no máximo duas semanas.

Toxicidade Crônica: efeito tóxico após exposição prolongada a doses cumulativas do agente tóxico, geralmente maior que três meses podendo chegar até há anos.

Toxicidade Subcrônica: repetidas exposições a xenobióticos químicos. Chama-se de intoxicação sobreaguda quando ocorre exposição durante um período menor ou igual há um mês. Entretanto, para períodos de exposição entre 1 a 3 meses, classifica-se como intoxicação subcrônica.

2.4.3. Toxicologia dos agrotóxicos

No Brasil, o Decreto Federal de número 4.074, 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei Federal número 7.802, de 11 de julho de 1989, em seu Artigo 1º, Inciso IV, caracteriza o termo agrotóxicos e afins como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, indicados para uso nos setores de produção agrícola, no armazenamento e melhoria de pastagens, proteção de florestas nativas, ambiente natural, urbanos, hídricos ou industriais. São usados para modificar a composição da flora ou da fauna, com o objetivo de preservá-las da ação prejudicial de seres vivos considerados

tóxicos. Dentre as substâncias empregadas temos, desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento, ou seja, refere-se às substâncias empregadas no combate de pragas como insetos, larvas, fungos e carrapatos, como também, no controle do crescimento da cultura, entre outras atribuições, (BRASIL, 2010).

A partir da Constituição Federal de 1988, o termo agrotóxico ao invés de defensivo agrícola passou a ser usado no Brasil, sendo esta modificação consequência da grande mobilização da sociedade civil organizada. A simples mudança na terminologia coloca este termo em destaque quanto a toxicidade dessas substâncias tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (BRASIL, 2010).

O maior emprego no uso de agrotóxicos é na agricultura, popularmente são chamados de remédios, venenos, defensivos, entre outros. São utilizados no controle de vetores (saúde pública), conservação de madeira, no armazenamento de grãos ou sementes e no controle de outros parasitas que possam acometer o homem e a pecuária, (BRASIL, 2010). A ANVISA, órgão de controle do Ministério da Saúde, classifica os agrotóxicos em quatro classes de perigo para saúde. Cada classe é representada por uma cor no rótulo e na bula do produto (**Tabela 1**).

Tabela 1: Classificação da toxicidade dos agrotóxicos. Fonte: CTISM, adaptado de ANVISA, 2011.

Classe	Grau	Cor da faixa
Classe I	Extremamente tóxico	Vermelha
Classe II	Altamente tóxico	Amarela
Classe III	Medianamente tóxico	Azul
Classe IV	Pouco tóxico	Verde

Os agrotóxicos também são classificados de acordo com o seu grupo químico ao qual pertencem e ao seu modo de ação (**Tabela 2**). É importante a forma de classificação dos agrotóxicos por ser útil tanto nas identificações das intoxicações quanto para a adoção de tratamentos exclusivos.

Tabela 2: Principais categorias de agrotóxicos quanto à sua ação e ao grupo químico ao qual pertencem.

Tipos de ação (classe)	Principais grupos químicos	Exemplos (produtos/substâncias)
Inseticidas (controle de insetos, larvas e formigas)	Organofosforados	Azodrin, Malathion, Parathion, Nuvacron, Tamaron, Hostation, Lorsban
	Carbamatos Organoclorados ¹ Piretroídes (sintéticos)	Carbaryl, Furadan, Lannate, Marshal Aldrin, Endrin, DDT, BHC, Lindane Decis, Piredam, Karate, Cipermetrina
Fungicidas (combate aos fungos)	Ditiocarbamatos	Maneb, Mancozeb, Dithane, Thiram, Manzate
	Organoestânicos Dicarboximidos	Brestan, Hokko Suzu Orthocide, Captan
Herbicidas (combate às ervas daninhas)	Bipiridílios Glicina substituída Derivados do ácido fenoxiacético Dinitrofenóis	Gramoxone, Paraquat, Reglone, Diquat Roundup, Glifosato, Direct Tordon, 2,4-D, 2,4,5-T ² Bromofenoxim, Dinoseb, DNOC
	Triazina	Stopper, Sinerge, Ametron

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2011.

2.5. Organofosforados e Carbamatos

São agroquímicos com uso abundante na agricultura e podem ser absorvida através da inalação, ingestão e quando expostos à pele. Quando absorvidos, são distribuídos aos tecidos do organismo através da corrente sanguínea e sofrem biotransformação, em particular no fígado. A principal via de eliminação é a renal. Sabe-se que a principal ação dos organofosforados e carbamatos no organismo humano é a inibição da enzima acetilcolinesterase nas terminações colinérgicas do sistema nervoso central e periférico.

As Colinesterases (ChEs) são serina hidrolases que envolvem dois tipos: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8), com base nas preferências de substrato, ACh e BCh, respectivamente. A acetilcolinesterase pertencente à família das colinesterases e tem função fisiológica na terminação das sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periférico. ACh é sintetizada no corpo da célula neural ou no axônio e em seguida transportada e armazenada em vesículas sinápticas. Esse processo é realizado por um transportador vesicular de ACh (VAChT), capaz de elevar em até 100 vezes sua concentração no interior dessas vesículas (VENTURA, 2010).

A liberação de ACh na fenda é resultado do sinal elétrico produzido pelo fluxo de íons através da membrana plasmática do neurônio pré-sináptico. Na parte interna do neurônio pré-sináptico contém uma alta concentração de K^+ e uma baixa concentração de Na^+ . A formação do gradiente eletroquímico formado através da membrana plasmática, os íons Na^+ começam a fluir para dentro da célula aumentando a despolarização e levando a mudança do potencial de membrana de $-60mV$ para cerca de $+30mV$ em um milissegundo. Quando a onda de despolarização chega aos canais de Ca^{2+} , logo são abertos pela voltagem. A elevação do $[Ca^{2+}]$ citoplasmático desencadeia a mobilização das vesículas em direção ao terminal sináptico, seguido de fusão das vesículas e exocitose de acetilcolina na fenda sináptica que se difunde para célula pós-sináptica, se liga aos receptores da ACh (**Figura 2**).

Dessa forma, a mensagem é passada para a próxima célula no circuito. A finalização da sinapse colinérgica ocorre pela ação de AChE, essencial no sistema nervoso, que termina rapidamente a ação de ACh liberada na fenda através da hidrólise, gerando como produtos colina e ácido acético, (BERG, 2014; LEHNINGER, 2006).

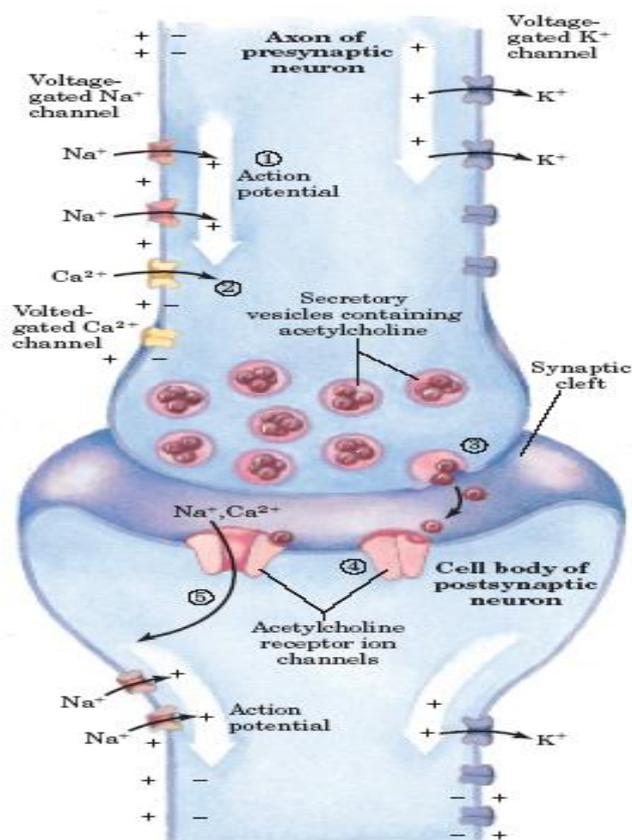


Figura 2. Sinapse colinérgica no sistema nervoso central

A inibição da acetilcolinesterase resulta na dessensibilização dos receptores de acetilcolina, pois a acetilcolina não é hidrolisada fazendo estes permanecerem em uma conformação semiaberta (**Figura 3**). Os organofosforados se ligam de forma covalente com uma serina presente no sítio ativo da acetilcolinesterase (AChE) inibindo sua ação, nos carbamatos a ligação não é covalente e o efeito é reversível.

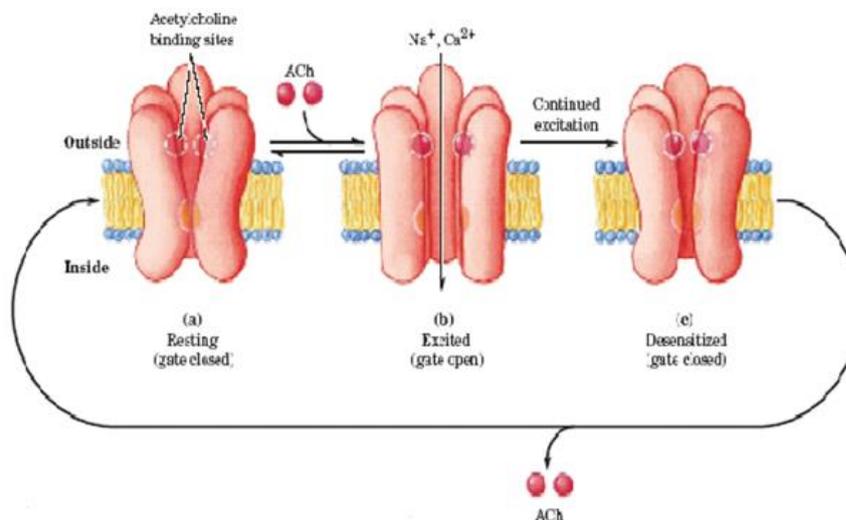


Figura 3. Inibição da acetilcolinesterase e a dessensibilização dos receptores de acetilcolina

2.5.1. Organoclorados

Agrotóxicos de degradação lenta, com eficiência de acumulação nos seres vivos e no meio ambiente, podem perdurar por até 30 anos no solo. São extremamente lipossolúveis e os seres humanos podem ser contaminados tanto por contato direto, como também através da cadeia alimentar, água e alimentos contaminados (BRASIL, 2010).

No Brasil, grande parte dos organoclorados utilizados na agricultura teve sua comercialização, uso e distribuição proibidos pela Portaria número 329, de 02 de setembro de 1985. Devido a sua grande capacidade residual e de uma provável ação carcinogênica (BRASIL, 2010).

2.5.2. Piretróides

Esse grupo teve seu uso em expansão nos últimos 20 anos e, além do uso na agropecuária, também são muito usados em ambientes domiciliar, aonde vem ocasionando um aumento dos casos de alergia em adultos e crianças. São ligeiramente absorvidos por vias, digestiva, respiratória e cutânea. A ocorrência de intoxicação aguda se dá principalmente quando a via de absorção é a respiratória. São estimuladores do Sistema Nervoso Central (SNC) e em concentrações elevadas podem ocasionar lesões no sistema nervoso periférico (BRASIL, 2010).

Na exposição aguda, os sinais e sintomas em evidencia são dormência nas pálpebras, nos lábios, espirros, coceira intensa, manchas na pele, edema nas pálpebras e convulsões, entre outros.

Embora não haja descrições e evidências de toxicidade crônica com o uso dessa classe química, alguns autores relatam efeitos de exposição em longo prazo como, neurites periféricas e alterações hematológicas do tipo leucopenias (BRASIL, 2010).

2.5.3. Herbicidas

Os herbicidas são utilizados tanto no controle de espécies indesejáveis no campo quanto na eliminação de vegetais matando-os ou impedindo seu crescimento. Nas duas últimas décadas, esse grupo vem sendo bastante utilizado na agricultura. Dentre alguns dos herbicidas comercializados no Brasil temos Paraquat, Glifosato, as Triazinas e derivados do ácido fenoxiacético.

2.5.4. Piriproxifeno (PPF)

O inseticida Piriproxifeno, 2- [1-metil-2- (4-fenoxifenoxi)] a base de piridina, é um análogo do hormônio juvenil que atua como regulador de crescimento em insetos, tendo sua eficácia sobre uma ampla variedade dos mesmos, foi primeiro sintetizado e desenvolvido Por Sumitomo Chemical Co. Ltd. na (década de 1990.1).

Nome químico, 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether, CAS de nº. 95737-68-1 tem peso molecular de $321,5 \text{ g mol}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ (**Figura 4**). É um sólido ceroso amarelo com ponto de fusão de $47,4^\circ\text{C}$ com densidade maior do que a água ($1,242 \text{ g/mL}$ a 25°C). À temperatura ambiente (25°C) e pH 6, o PPF é pouco solúvel em água ($0,367 \pm 0,004 \text{ mg/L}$) porém, é altamente solúvel em solventes orgânicos como hexano (400g/kg a 20°C) e xileno (500g/kg a 20°C). Apresenta pH de 6,41 a 20°C e nenhuma característica ácida ou básica perceptível. Este produto é registrado sob o número 3.2586.0009.001-1 (Sumilarv[®] 0,5G) Sumitomo Chemical do Brasil na ANVISA/Ministério da Saúde.

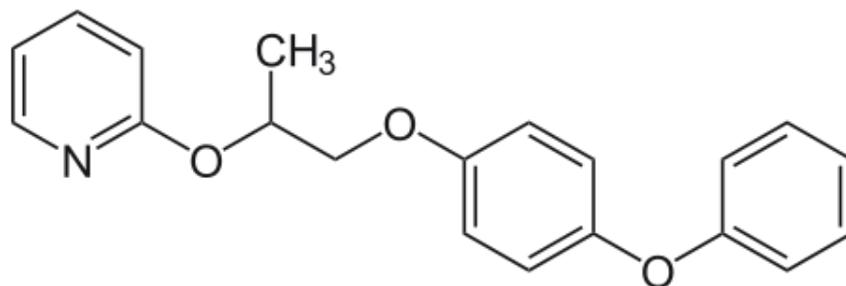


Figura 4. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Piriproxifeno#/media/File:Pyriproxifen.svg>

Tem sido utilizado para controlar o mosquito *A. aegypti* no Brasil desde 2014 (BRASIL, 2014). Sua utilização está em conformidade com as Diretrizes para a Qualidade da Água Potável (DQAP) (WHO, 2007) da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Esquema de Avaliação de Pesticidas (EAP) (WHOPES, 2012). Para seu uso na água potável recomenda-se 0,01mg do princípio ativo/litro, conforme a (OMS) (WHO, 2007). Um quilograma do PPF 0,5G é possível tratar 500.000 litros de água (por exemplo, 500 caixas d'água de 1.000 litros).

Inicialmente foi usado no combate de pragas agrícolas (WHO, 2008). É dito que o PPF tem inibição de 95% do surgimento de larvas de mosquitos, e nenhum efeito sobre populações de predadores (NAYAR et al., 2002). Usado na horticultura para controlar espécies de insetos, como, a mosca comum (*Musca domestica*), formiga de fogo (*Solenopsis invicta*) e mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) (SULLIVAN; GOH, 2008). Também tem sido amplamente utilizado em culturas de citrinos em Israel, África do Sul, Espanha e Itália, também recomendado pela OMS para a utilização em recipientes de armazenamento de água potável no controle da malária.

É relatado que o PPF exerce uma inibição eficaz, mas não completa das características dos insetos adultos e da perturbação do desenvolvimento das larvas (WANG et al., 2013). Segundo Anogwih et al., (2015), faz-se necessário o uso de tratamentos em programas destinados a controlar com eficácia mosquitos, usando uma combinação de concentrações de larvicidas baixas e seguras, em somatória com peixes larvívoros. A aplicação de larvicidas em baixas concentrações toleráveis aos peixes resultou em controle biológico efetivo (ANOGWIH et al., 2013). Até à data, poucos estudos examinaram o

efeito deste larvicida em relação ao neurodesenvolvimento e ao sistema nervoso central. Entretanto, as suspeitas quanto à sua segurança permaneceram (BAR-YAM et al., 2016; EVANS et al., 2016) e o estado do Rio Grande do Sul em fevereiro de 2016 suspendeu o uso deste princípio ativo (EBC, 2016).

Uma vez tratados com este ingrediente ativo, o mesmo regula uma variedade de processos no desenvolvimento pós-embrionário e reprodutivo de adultos, resultando em uma interrupção no ciclo de vida e na quebra de ovos em muitas espécies de insetos (WHEELER, 2003; RIDDIFORD, 1970). O PPF apresenta perigo agudo, praticamente não tóxico para as aves, não é cancerígeno ou genotóxico (WHO, 2009). Como dito anteriormente, este larvicida é um poderoso agonista do hormônio juvenil (SULLIVAN; GOH, 2008), inibindo o desenvolvimento das larvas em maturação (MEOLA et al., 2000). Portanto, o PPF interfere preferencialmente no desenvolvimento juvenil, na eclosão de ovos de pulgas e carrapatos, é relativamente estável no ambiente, (KATAGI; TAKAHASHI, 1994), e ativo em locais de reprodução do *Aedes aegypti* durante 05 meses (DARRIET et al., 2010).

Este regulador de crescimento foi testado por Trayler; Davis (1996), que calcularam CE_{50-48h} de 0,08 mg/L para o cladóceros *Daphnia carinata*. Na concentração subletal de 0,01 mg/L os autores observaram baixa fecundidade, produção de efípios, baixo crescimento e diminuição da biomassa dos indivíduos expostos ao larvicida.

De acordo com Sullivan (2000), este composto químico tem uma meia-vida média de 5,04 d em água, e 16-21 d nos sedimentos (WHO, 2008), e seus efeitos sobre *Cladocera* e outros crustáceos podem ser reduzidos devido a sua capacidade de recuperação.

Dentre as diferentes concentrações de PPF (0,63 $\mu\text{g} / \text{L}$ a 20 $\mu\text{g} / \text{L}$) utilizadas, por Caixeta et al., (2016), para alterações comportamentais de *Xiphophorus maculatus*, determinou-se que a concentração sem efeito observado (NOEC) e a menor concentração de efeito observado (LOEC) do princípio ativo foi de 2,5 e 5 $\mu\text{g} / \text{L}$, respectivamente.

Ainda que, o PPF seja um pesticida consideravelmente novo, sua avaliação no risco ecotoxicológico em organismos de ecossistemas aquáticos é importante para conseguir um equilíbrio adequado entre a quantidade de pesticida utilizada para controlar insetos bem como a gestão ambiental racional. Com isso, há preocupação crescente com as massas de água, já que os ecossistemas aquáticos são os locais de descarte final dos resíduos (SILVA et al., 2016), e uma via de contaminação da água se dá ao uso de pesticidas para controlar vetores (ABE et al., 2014; PEREIRA; De CAMPOS JÚNIOR, 2015).

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Caracterização do Local de Estudo

O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Aquicultura (LAQUA) do Centro de Ciências Agrárias – CECA/UFAL, as análises foram feitas no Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia – LBE/UFAL e no Laboratório de Histopatologia na Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. No período de agosto de 2016 a fevereiro de 2017.

A substância utilizada (Piriproxifeno) foi obtida a partir de fontes comerciais disponíveis. A substância presente na formulação comercial é de 100g/L (10% m/v).

3.2. Implantação do estudo

Os exemplares de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) em fase de alevinos (30 dias de vida) foram obtidos da Estação de Piscicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas – CECA/UFAL. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – UFAL, sob o número 57/2016.

Os exemplares foram aclimatados por um período de 10 dias, mantidos e monitorados em um tanque circular pré-moldado de lona de PVC, com capacidade de 2,4 m³, em sistema de recirculação com aerador de 1 Hp, constando de filtros de cartucho com 20 micras, filtro biológico contendo ostras,

bioballs, porcelana, telas de pvc e bactérias colocadas de forma exógena e filtro *Jebo*.

Durante esse período, os parâmetros de qualidade de água (oxigênio dissolvido, temperatura, pH, alcalinidade, potencial de oxido-redução, nitrato e total de sólidos dissolvidos) foram monitorados por sonda multiparamétrica (HANNA Instruments, modelo 9828, Woonsocket, USA). Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada (3 mm), com frequência alimentar de 3 vezes ao dia, contendo: 45% (mínimo) de proteína bruta, de acordo com especificação do fabricante.

Após o período de aclimatação os animais foram submetidos aos ensaios de toxicidade. A pesquisa foi composta de três experimentos independentes, toxicidade aguda, crônica e subcrônica.

Variáveis da qualidade de água: Durante o período experimental foram controlados os parâmetros de qualidade da água nos aquários experimentais utilizando o equipamento por meio de sonda multiparâmetros (HANNA Instruments, modelo 9828, Woonsocket, USA). As variáveis como pH, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg/L) foram medidos e registrados a cada 24 horas (ABNT, 1993).

Análise estatística: foi realizada utilizando software prisma GraphPad 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA , EUA), método (PROBIT) e análise de variância (ANOVA) onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% de probabilidade e expressos em média \pm desvio padrão.

3.3. Teste de toxicidade aguda

180 exemplares de alevinos com peso médio inicial de $3,5 \pm 0,5$ g, com comprimento médio de $4,5 \pm 0,5$ cm foram transferidos para aquários experimentais de 20L, (**Figura 5**) contendo 15L de água e submetidos ao teste de toxicidade aguda. O delineamento experimental contou com um total de 09 tratamentos, (0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0 mg/L), para o cálculo

das concentrações utilizou-se a fórmula: $(C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2)$, em duplicata, sendo a unidade experimental 10 animais por aquário.



Figura 5. Biometria inicial e transferência para os aquários experimentais

Utilizaram-se pipetas volumétricas para adição da substância química na água. Durante o experimento os peixes foram mantidos em sistema estático por 96h, em sistema contínuo de aeração. A cada 24h era observado o número de mortos em cada tratamento, caso houvesse, o mesmo era registrado e retirado imediatamente do aquário. Foi adotado como critério de avaliação da mortalidade a falta de movimentos e nenhuma reação a estímulos táteis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade de água

Quanto a variáveis indicadoras de qualidade de água: temperatura, oxigênio dissolvido e pH no experimento de toxicidade aguda, as análises estatísticas demonstraram não ocorrer diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos (**Tabela 3**).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água de diferentes concentrações do Piriproxifeno no ensaio de toxicidade aguda

Concentração PPF (mg/L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Temperatura (°C)	Ph
0,0 Controle	6,83 ± 0,14	24,22 ± 0,57	6,70 ± 0,14
0,25	6,60 ± 0,31	24,38 ± 0,55	7,33 ± 0,23
0,5	6,53 ± 0,27	24,31 ± 0,49	7,27 ± 0,31
1,0	6,58 ± 0,25	24,70 ± 0,45	7,30 ± 0,25
2,5	6,60 ± 0,38	24,48 ± 0,81	7,14 ± 0,24
3,0	6,58 ± 0,29	24,25 ± 0,30	7,15 ± 0,18
4,0	6,25 ± 0,35	24,25 ± 0,35	6,75 ± 0,35
5,0	6,15 ± 0,31	24,27 ± 0,37	7,18 ± 0,29
10,0	6,47 ± 0,37	24,15 ± 0,38	7,23 ± 0,18

Determinou-se a CL₅₀ do PPF de acordo com os índices de mortalidade no período de 24h e 96hs conforme (Tabela 4).

A taxa de mortalidade de 100% foi obtida a partir das maiores concentrações do ingrediente ativo (Figura 6).

Tabela 4. A média de mortalidade de *O. niloticus* em concentrações crescentes de Piriproxifeno no teste de toxicidade aguda aos períodos de exposição de 24 e 96h.

Concentração mg/L	Média de porcentagem de <i>O. niloticus</i> (n= 180)	
	24h período de exposição	96h período de exposição
0,0 Controle	0,00	0,00
0,25	0 ± 0,00	0 ± 0,00
0,5	0 ± 0,00	0 ± 0,00
1,0	0 ± 0,00	0 ± 0,00
2,5	0 ± 0,00	15 ± 0,07
3,0	0 ± 0,00	75 ± 0,07
4,0	0 ± 0,00	100 ± 0,00
5,0	15 ± 0,07	100 ± 0,00
10,0	45 ± 0,35	100 ± 0,00

Meios de ensaio de toxicidade realizados em duplicatas, de acordo com a ABNT, 2016.

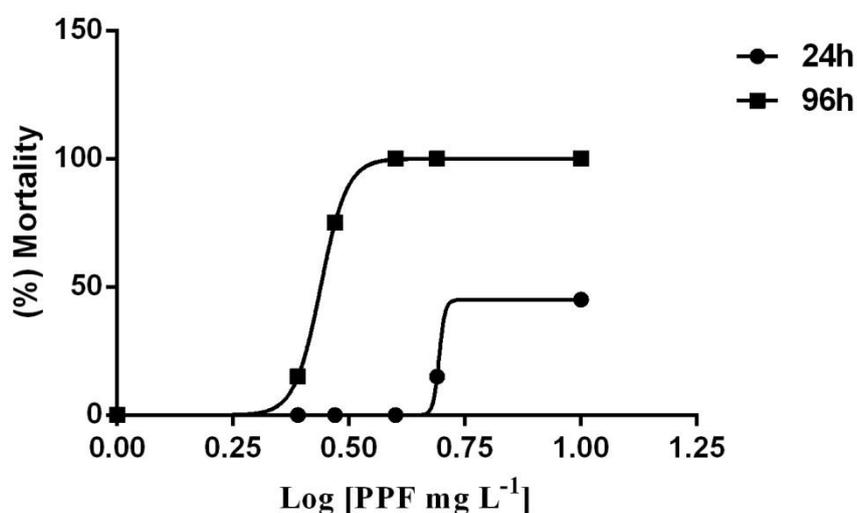
O resultado do teste de toxicidade aguda revelou que a mortalidade dos alevinos de Tilápias após 96h de exposição ocorreram nas concentrações entre 2,5 mg/L e 10 mg/L; nas concentrações a partir de 4,0 mg/L causaram 100% e 3,0 mg/L causou 75% de mortalidade em alevinos expostos ao ingrediente ativo. A média de mortalidade dos alevinos de Tilápias do ensaio de toxicidade

durante os tempos de exposição de 24h e 96h estão apresentados respectivamente, na (Tabela 4). Indicando, que o aumento da concentração influencia uma maior taxa de mortalidade concomitante com o período de exposição.

Os valores de CL_{50} de 24h obtidos com alevinos de Tilápias para a formulação comercial foi de ($CL_{50}= 10,70$ mg/L), o intervalo de confiança de 95% foi de (9.52 para 11.87) . Já os valores de CL_{50} de 96h obtido foi de ($CL_{50}=2,77$ mg/L), o intervalo de confiança de 95% foi de (1.381 para 1.412), esses resultados demonstram que quanto maior for o tempo de exposição a formulação comercial de PPF menor será a concentração que irá causar mortalidade nos peixes.

A concentração de campo recomendada para o uso de formulações comerciais de PPF com 100g/L é de (0,625g - 10g / 100L de água). O presente estudo demonstrou que a CL_{50} de 24h e 96h calculadas obteve valores bem abaixo desta concentração de campo recomendada sendo de (10,70 mg/L e 2,77 mg/L, respectivamente). De modo que os alevinos expostos mais longamente a formulações comerciais de PPF, maior será a toxicidade observada.

Figura 6. Determinação da CL_{50} e percentual de mortalidade de exemplares de alevinos de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) no período de exposição 24 e 96 horas.



24h-CL₅₀ 10,70 mg/L, com intervalo de confiança de 95% (9,52 a 11,87). 96h-CL₅₀ 2,77mg/L, com intervalo de confiança de 95% (1,381 a 1,412) Desvio padrão $\pm 0,1941 \pm 0,3245$.

5. CONCLUSÃO

A CL₅₀ do PPF no período de exposição de 24h para *O. niloticus* foi de 10,70mg/L; Entretanto, no período de exposição de 96h a CL₅₀ foi de 2,77mg/L;

Mortalidades foram observadas a partir de concentrações 2,5mg/L do princípio ativo;

3.3.1 Teste de toxicidade crônica

No teste de toxicidade crônica os exemplares de Tilápia do Nilo com peso médio inicial de $5,1 \pm 0,19$ g, com comprimento médio de $6,4 \pm 0,1$ cm foram submetidos à biometria, posteriormente foram transferidos para os aquários experimentais de 20L e submetidos aos testes de toxicidade crônica. O delineamento experimental contou com um total de 04 tratamentos com base no valor da CL₅₀ obtida no ensaio anterior (*toxicidade aguda*) (0,0; 0,875; 1,75; 3,5mg/L) em triplicata, 12 aquários, sendo a unidade experimental 08 animas por aquário, totalizando 96 animais para este experimento (**Figura 7**). Durante o experimento os peixes foram mantidos em sistema estático por 96h, em sistema contínuo de aeração.



Figura 7. Montagem do experimento: A – Biometria; B – Distribuição dos animais nos aquários experimentais; C – Manejo diário.

Após cada 24h eram capturados dois animais de cada aquário, anestesiados com TRICAINA MS222 com dose de 150mg/L, causando

inconsciência e posterior perfuração craniana, de acordo com o Item 8.2.9.3 da Resolução nº13/2013. Os cérebros foram removidos (**Figura 8**), etiquetados, embalados em papel alumínio com seu respectivo tratamento e período de exposição e congelados em nitrogênio líquido e depois em freezer -20°C até a análise.



Figura 8. Extração do cérebro de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*)

3.3.2. Preparação do extrato cerebral

Para o preparo do extrato de cérebro, reuniram-se um pool de três cérebros que foram medidas as massas e macerados sob banho de gelo em uma solução refrigerada de NaCl a 0,9% (v/v) (80 mg:1mL NaCl a 0,9%) e em seguida transferidos para homogeneizador de vidro Potter, parcialmente submerso em banho de gelo. A ruptura de células foi realizada em Ultrassom Fisher Scientific Sonic (5 ciclos de 15'' com intervalos de 15'') a uma frequência 22,5 KHz. Os intervalos foram em banho de gelo para resfriamento da haste metálica do ultrassom (**Figura 9**).

Este procedimento foi realizado nos cérebros tanto dos animais expostos ao larvicida, como também nos animais do grupo controle. Em seguida, o homogenato de células de cérebro foi utilizado para determinar a atividade da enzima colinesterase e quantificação da proteína total.

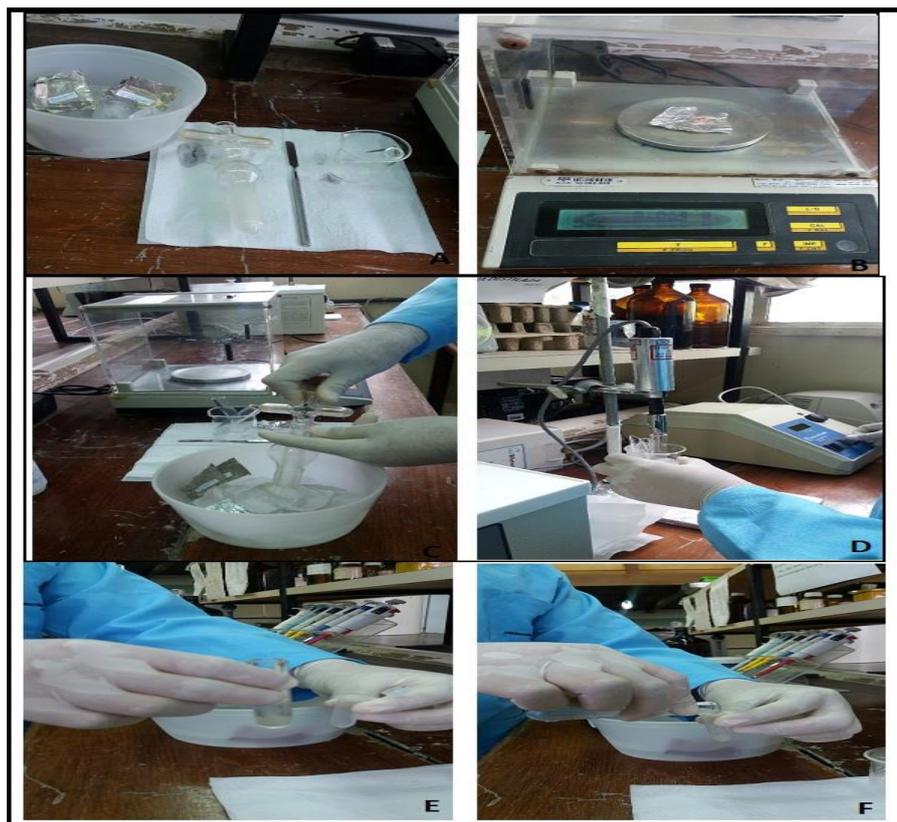


Figura 9. Procedimento de preparo do homogenato de células cerebral: A - Descongelamento do cérebro; B - Pesagem em balança analítica; C - Homogeneização; D - Disruptor de células; E - Homogenato bruto; F - Transferência para eppendorf para leitura em espectrofotômetro.

3.3.3. Determinação de Atividade da Enzima ChEs

A metodologia utilizada para o ensaio da atividade colinesterásica para cérebro de *O. niloticus* foi baseada no método de Ellman et al. (1961). Essas atividades foram quantificadas a um comprimento de onda de 412nm em espectrofotômetro UV/VIS (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2) usando acetiltiocolina (ATCh) como substrato.

O ensaio foi realizado em uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) a 0,1 M e pH 8,0; solução 0,01 M de ácido 5,5- Ditiobis-[2-nitrobenzóico (DTNB), solução 0,075 M de iodeto de acetiltiocolina (AChI) como substrato para ChE, e a diluição dos extratos de cérebro respectivamente. Para a leitura do branco, foi adicionado água desmineralizada ao invés do substrato ATCh. O tempo de reação foi de 5 minutos e todos os ensaios foram realizados em triplicata. O volume final utilizado foi de 1,5 mL.

A unidade da atividade colinesterásica (U) representa uma quantidade de enzima catalisando a hidroxilação de 1µmol de substrato por minuto (U=µmol.min⁻¹).

A atividade da enzima foi calculada de acordo com:

$$U / mL = \frac{\Delta A / \Delta t}{\varepsilon} \times \frac{V}{V_e / D}$$

Onde:

V é o volume total da mistura reacional (V = 1,5 mL);

ΔA/Δt é a inclinação da reta;

ε é o coeficiente de extinção molar do DTNB (ε = 14,15 mM⁻¹.cm⁻¹);

V_e é o volume do extrato enzimático;

D é a diluição do extrato;

3.3.4. Quantificação de Proteína

A curva de calibração de proteínas foi construída empregando-se albumina de soro bovino como padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada a 595 nm de acordo com Bradford (1976) e determinadas em espectrofotômetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2), utilizando-se água em lugar de solução-padrão para o branco. Todos os ensaios foram realizados em três repetições.

3.3.5. Análise do Comportamento Locomotor (Vídeo rastreamento)

Depois dos tratamentos controle ou expostos ao PPF durante 4h e 96h o comportamento dos peixes foi filmado usando uma câmera digital Finepix 4500 (Fujifilm, Brazil) (**Figura 10**) posicionada a 30 cm do aquário em que os peixes se encontravam em visão lateral. Os vídeos foram gravados em 320x240 pixels e 30 frames por segundo (FPS) durante 10 minutos. Esta resolução do filme foi o suficiente para o rastreamento dos peixes.



Figura 10. Análise do Comportamento Locomotor (Vídeo rastreamento)

Após as filmagens, os vídeos foram transformados em 4 FPS usando o software Virtual Dub 1.10.4, AVERY LEE (2012), sendo portanto utilizado 4 imagens dos peixes por segundo para as análises de comportamento locomotor, obtendo-se um total de 2400 pontos de coordenada X,Y, que descreveram o comportamento de cada peixe analisado. O vídeo rastreamento foi realizado usando o software Image J 1.49v (National Institutes of Health – NIH, USA) associado ao plug-in MTrackJ (Meijering et al., 2012; Erasmus University Medical Center, Holanda). Este software e plug-in foram utilizados para calcular os seguintes parâmetros:

- Distância percorrida (cm): Quantifica o comprimento da trajetória do peixe no aquário começando do primeiro ponto de coordenada da trajetória até o seu último ponto;
- D2S (cm): Distância média do primeiro ponto de coordenada até o ponto atual;
- D2P (cm): Distância média do ponto de coordenada atual para o ponto anterior;
- θ (graus): Média do ângulo do componente em plano do vetor mais recente da trajetória associada ao sistema de coordenadas X,Y da imagem do comportamento. Os valores angulares variam entre -180 e +180 graus, onde 0 significa que o componente do vetor segue paralelo ao eixo positivo (apontando a direita), +90 graus (ou -90 graus) significa

que este vetor segue em paralelo ao eixo positivo ou negativo apontando para baixo ou para cima respectivamente; e +180 graus o vetor segue paralelo ao eixo negativo apontando para esquerda;

- $\Delta\theta$ (graus): Mensura a mudança angular entre o vetor do ponto mais recente, apontando a partir do ponto anterior para o ponto atual da trajetória, relativo ao plano X,Y da imagem do comportamento;
- Velocidade média (cm/s): Distância percorrida no tempo;

4. RESULTADOS

4.1. Qualidade de água

Na **tabela 5** encontram-se os parâmetros físico-químicos da água avaliados em diferentes concentrações do PPF, não foi observado diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos ao longo do experimento.

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos da água de diferentes concentrações do Piriproxifeno no ensaio de toxicidade crônica de 96h.

Concentração PPF (mg L)	Oxigênio dissolvido (mg L)	Temperatura (°C)	Ph
0.0 Controle	6,72 ± 0,07	24,35 ± 0,02	6,94 ± 0,18
0.875	6,56 ± 0,09	24,05 ± 0,18	7,26 ± 0,09
1,75	6,67 ± 0,07	24,17 ± 0,11	6,95 ± 0,10
3,5	6,65 ± 0,12	24,35 ± 0,15	7,04 ± 0,14

4.2. Análise do comportamento locomotor

Os peixes analisados após 4 e 96h de exposição à concentrações de formulações comerciais do PPF, não mostraram alterações no seu comportamento locomotor (**Tabela 6 e 7**). Entretanto, os peixes analisados 28 dias após a exposição ao PPF mostraram redução na distância percorrida dentro do aquário, velocidade média, no parâmetro de trajetória D2P e no parâmetro de mudança angular da trajetória $\Delta\theta$.

Tabela 6. Distância percorrida (cm), valores de D2S (cm), D2P (cm), θ (graus), $\Delta\theta$ (graus) e velocidade média (cm/s) do comportamento locomotor de *O. niloticus* expostas ao PPF ao 0,875 e 1,75 mg/L durante 4h.

4 horas	Distância	D2S	D2P	θ	$\Delta\theta$	Velocidade
Controle	1391,7±305,6	11,5 ± 4,2	0,5 ± 0,1	4,5 ± 3,4	-4,4 ± 1,7	2,3 ± 0,4
0,87 mg/L	1229,6±201,1	9,3 ± 1,2	0,5 ± 0,08	7,5 ± 3,1	-0,1 ± 1,4	2,0 ± 0,3
1,75 mg/L	1415,5±280,3	14,0 ± 4,3	0,5 ± 0,1	3,8 ± 4,1	-0,6 ± 0,8	2,3 ± 0,4
3,5 mg/L	1228,3±361,5	12,5 ± 2,90	0,5 ± 0,1	1,2 ± 3,6	0,2 ± 0,7	2,0 ± 0,6
P	0.553	0.130	0.508	0.066	0.295	0.511

Tabela 7. Distância percorrida (cm), valores de D2S (cm), D2P (cm), θ (graus), $\Delta\theta$ (graus) e velocidade média (cm/s) do comportamento locomotor de *O. niloticus* expostas ao PPF ao 0,875 e 1,75 mg/L durante 96h.

96 horas	Distância	D2S	D2P	θ	$\Delta\theta$	Velocidade
Controle	1747,0±562,3	11,5 ± 4,2	0,7 ± 0,2	0,7 ± 4,4	-1,0 ± 1,1	2,9 ± 0,9
0,87 mg/L	1527,5±121,7	11,5 ± 1,9	0,6 ± 0,05	2,6 ± 1,7	-0,2 ± 0,8	2,5 ± 0,2
1,75 mg/L	1752,3±242,8	10,2 ± 2,4	0,7 ± 0,1	-2,4 ± 1,9	0,2 ± 0,7	2,9 ± 0,4
P	0.436	0.268	0.385	0.041	0.078	0.435

4.3. Análise de biomarcadores enzimáticos

Após a exposição às diferentes formulações comerciais de PPF, a concentração de proteína no homogenato cerebral de *O. niloticus* foi analisada para todos os tratamentos (**Figura 11**).

Ao observar a concentração de proteína ao longo do tempo de exposição em distintas concentrações de formulações comerciais de PPF pode ser visto que houve variação significativa às 96h para a exposição com a maior concentração de PPF, ocasionando um aumento de 11% na concentração de proteína.

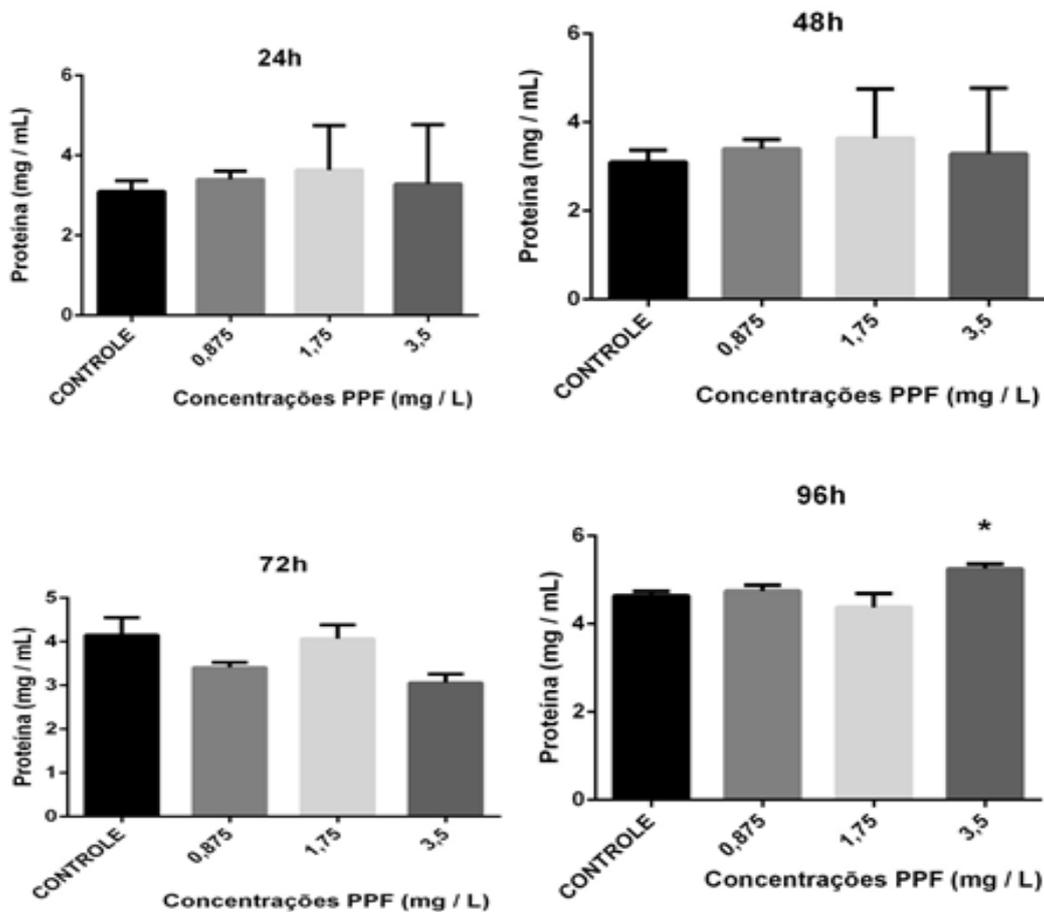


Figura 11. Concentração de proteína no extrato cerebral de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta a distintas concentrações de PPF por 96 h.

Na (Figura12), pode-se observar a atividade específica de AChE cerebral no homogenato de cérebro de *O. niloticus* expostos a distintas concentrações de formulação comercial de PPF. Após 48h de exposição, foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de atividade específica de AChE na concentração de 0,875 mg/L de formulações comerciais de PPF com 23% de redução da atividade, e um aumento da mesma em 18% na exposição à concentração de 1,75mg/L quando comprado a atividade do controle. Após 96h de exposição a 3,5mg/L do PPF, apresentou variação significativa na atividade específica de AChE cerebral em torno de 16% de redução da atividade específica.

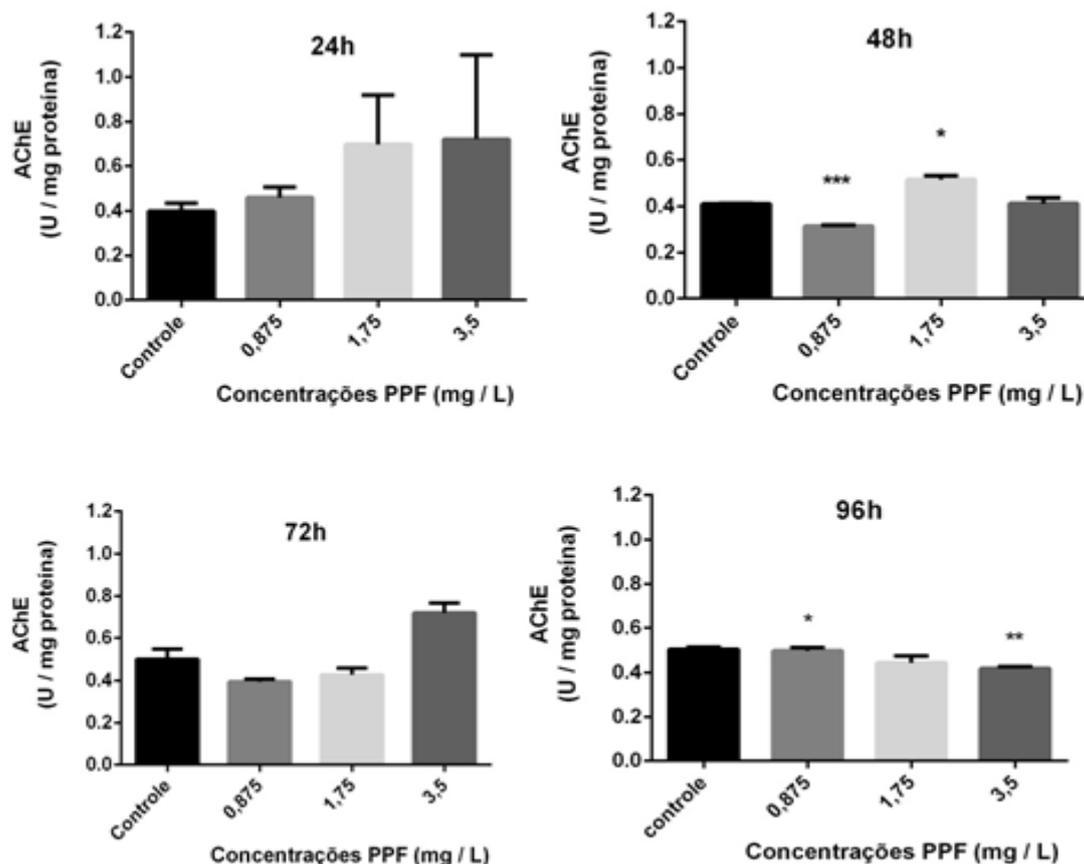


Figura 12: Atividade específica da acetilcolinesterase no cérebro de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta a distintas concentrações de formulações comerciais de PPF por 96h.

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise do comportamento locomotor

O peixe *Xiphophorus maculatus* larvívoro vem sendo usado no controle de larvas de *Aedes aegypti*. A literatura cita estudo de exposição de *X. maculatus* a distintas concentrações de PPF (0; 0.63; 1.25; 2.5; 5; 10; 20 μ g/L) por 96h (CAIXETA et al., 2016). Não tendo sido observado morte, mas diferenças comportamentais tais como, natação errática, perda de equilíbrio, letargia; natação errática, perda de equilíbrio, letargia, imobilidade; natação errática, perda de equilíbrio, letargia, imobilidade após 24, 72 e 96h de exposição, respectivamente.

No presente estudo Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) exposta a concentrações mais altas de PPF no período de 96h de exposição não apresentaram alterações no seu comportamento locomotor (**Tabela 5**).

5.2. Análise de biomarcadores enzimáticos

O efeito tóxico de PPF foi também avaliado em minhocas *Aporrectodea caliginosa* por (NASR et al., 2015). No qual foi quantificado a resposta de biomarcadores como acetilcolinesterase e de enzimas antioxidantes como polifenol oxidase e glutathiona-S-transferase no qual observou uma redução da atividade específica de AChE (16 a 19%) após quatro semanas nas concentrações mais altas de PPF testadas.

Todavia o PPF apresenta maior efeito inibitório sobre a atividade específica das enzimas polifenol oxidase e glutathiona-S-transferase. No presente estudo a espécie *O. niloticus* apresentou valores percentuais de redução da atividade específica de AChE após 24h, valores estes compatíveis aos obtidos com a *A. Caliginosa* expostas a distintas concentrações do PPF durante quatro semanas de exposição (NASR et al., 2015).

A inibição de ChE também tem sido correlacionada aos efeitos comportamentais em ocasiões mais complexas envolvendo a relação de peixes expostos com suas potenciais presas (MORGAN; KICENIUK, 1990) ou predadores (SANDAHL et al., 2005).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou o efeito significativo na atividade específica da AChE cerebral em todas as concentrações testadas do PPF, em um período de exposição de 96h. Os resultados também mostraram que o PPF apresentou variações na atividade específica da AChE somente a partir de 48hs de exposição.

O PPF alterou a concentração de proteína no extrato cerebral de *O. niloticus* no período de 96h à concentração de 3,5mg/L.

Não foram observadas diferenças significativas no comportamento locomotor dos animais expostos ao larvicida no período de 96h.

Estes resultados sugerem que as variações na atividade específica da AChE cerebral durante os períodos de exposição podem ser parâmetros na avaliação de danos causados pelo larvicida, possibilitando respostas de aviso antecipado parcialmente àqueles que ocorrem espontaneamente no ambiente.

3.3.2. Teste de toxicidade subcrônica

Para o teste de toxicidade subcrônica foram utilizados 120 exemplares de alevinos com peso médio inicial de $3,5 \pm 0,5$ g, com comprimento médio de $4,5 \pm 0,5$ cm, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 20 aquários de 20L cada um com volume de 15L de água. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado com 05 tratamentos (0,0; 0,4; 0,8; 1,2, 1,8mg/L), cada tratamento com 4 repetições com densidade e estocagem de 6 animais por unidade experimental, durante um período de exposição de 28 dias.

Durante o teste, os exemplares receberam alimentação diária, com uma frequência de arraçoamento de três vezes ao dia (08hs: 00min; 12hs: 00min e às 16hs: 00min), com ração comercial com 45% de proteína bruta ofertada *ad libitum*. Os animais foram mantidos sob sistema constante de aeração, onde os aquários eram sifonados diariamente, com troca parcial e total de água de diluição (controle) e do princípio ativo (PPF) em dias alternados. Toda água do ambiente de experimentação foi filtrada a 10 micras e esterilizada por ultravioleta.

Foi adotado como critério de avaliação da mortalidade a falta de movimentos e nenhuma reação a estímulos táteis, após essa observação os animais eram removidos imediatamente dos aquários experimentais, pesados, medidos e identificados com seu respectivo tratamento e data.

Após 28 dias de exposição, os animais foram mantidos em jejum por 24h, em seguida anestesiados com TRICAINA MS222 com dose de 150mg/L, causando inconsciência e posterior perfuração craniana, de acordo com o Item 8.2.9.3 da Resolução nº13/2013. Em seguida foram submetidos à biometria final por meio de uma balança digital com precisão de 0.01g, (SHIMADZU,

modelo ELB300) para posteriormente avaliação dos parâmetros zootécnicos e retirada dos tecidos.

Os parâmetros de desempenho zootécnico avaliados foram: peso médio final (g) (Pf); ganho de peso diário (g) (GPd): $GPd = \text{peso médio final menos peso médio inicial dividido pelo número de dias do experimento}$; conversão alimentar aparente (CAA): quantidade total de ração seca fornecida aos peixes dividido pelo ganho de peso total (peso médio final menos peso médio inicial); taxa de sobrevivência (%) (TS): $TS = \text{número final de peixes dividido pelo número inicial de peixes multiplicado por 100}$ e $TCE = (TCE = 100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ Peso inicial}) / \text{tempo do experimento})$. Onde, $\ln = \text{logaritmo natural}$.

3.3.3. Análise do Comportamento Locomotor (Vídeo rastreamento)

Os tratamentos controle, e as concentrações de PPF de 0,8mg/L e 1,2mg/L foram filmados após um período de 28 dias (**Figura 13**) usando uma câmera digital Finepix 4500 (Fujifilm, Brazil) posicionada a 30 cm dos aquários em que os peixes se encontravam em visão lateral, visando compreender o comportamento dos mesmos. Os vídeos foram gravados em 320x240 pixels e 30 frames por segundo (FPS) durante 10 minutos. Esta resolução do filme foi o suficiente para o rastreamento dos exemplares experimentais.



Figura 13. Análise do Comportamento Locomotor (Vídeo rastreamento)

Após as filmagens, os vídeos foram transformados em 4 FPS usando o software Virtual Dub 1.10.4 (AVERY LEE, 2012), sendo portanto utilizado 4 imagens dos peixes por segundo para as análises de comportamento locomotor, obtendo-se um total de 2400 pontos de coordenada X,Y, que

descreveram o comportamento de cada indivíduo analisado. O vídeo rastreamento foi realizado usando o software Image J 1.49v (National Institutes of Health – NIH, USA) associado ao plug-in MTrackJ (Meijering et al., 2012; Erasmus University Medical Center, Holanda). Este software e plug-in foram utilizados para calcular os mesmos parâmetros do ensaio anterior (teste de toxicidade crônica).

3.3.4. Análise Histopatológica

O fígado do peixe foi removido, dissecado e pesado. Logo após, fragmentos de tecido hepático com 3,0 mm de espessura foram cortados e logo imerso em solução de formol em tampão fosfato (10%), permanecendo no mesmo por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram imersos em álcool 70% e armazenados para processamento posterior.

Após a fixação, as amostras do fígado foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, até etanol absoluto, diafanizadas em xilol, infiltradas e incluídas em parafina. Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo para obtenção de cortes transversais com 4 μ m de espessura, estes foram corados com hematoxilina-eosina, fotografados em microscópio óptico Diagtech (Brazil) acoplado a uma câmera (Motic 2300, Hong Kong) conectada um computador e analisados usando o software biométrico Motic Images Plus 2.0 (Hong Kong).

As descrições microscópicas foram realizadas considerando a estrutura do fígado de Tilápias descrita em Vicentini et al., (2005).

No início do experimento, a homogeneidade dos lotes dos animais foi comprovada pelo teste Cochran, ($p < 0,05$). Os resultados obtidos no estudo com toxicidade subcrônica foram avaliados pelo programa Systat 13.0, pacote SPSS da Microsoft, por meio da análise de variância (ANOVA), à probabilidade de 95%, e quando apresentaram diferenças significativas, foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$) e teste de Kruskal-Wallis (ZAR, 1984).

4. RESULTADOS

4.1. Qualidade de água

Os parâmetros de qualidade de água nesta etapa experimental a exemplo do experimento de toxicidade aguda, também não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($p>0,05$), conforme (**Tabela 8**) abaixo.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos da água de diferentes concentrações do Piriproxifeno no ensaio de toxicidade subcrônico de 28 dias.

Concentração (mg /L)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	Temperatura (°C)	Ph
0.0 Controle	6,64 ± 0,09	24,20 ± 0,22	6,85±0,12
0,4	6,56 ± 0,07	24,08 ± 0,05	7,24±0,09
0,8	6,66 ± 0,02	24,23 ± 0,10	6,98±0,04
1,2	6,73 ± 0,06	24,30 ± 0,19	7,17±0,07
1,8	6,70 ± 0,13	24,40 ± 0,10	7,10±0,12

Os valores dos parâmetros zootécnicos para comprimento total (CT), ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de crescimento específico (TCE) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos no presente estudo ($p<0,05$) (**Tabela 9**).

Durante o período experimental de 28 dias, não foi notificado nenhuma mortalidade no grupo controle. Sob as concentrações de 1,2 e 1,8mg/L, observou-se uma diminuição da ingestão de alimentos em comparação ao controle. Nos tratamentos controle, 0,2; 0,4 e 0,8mg/L não houveram diferenças significativas na análise de CT, porém, os tratamentos com maiores concentrações (1,2 e 1,8mg/L) apresentaram menores comprimentos ao longo dos 28 dias de experimento ($p<0,05$).

Em relação à CAA, os tratamentos de 1,2 e 1,8mg/L apresentaram os piores resultados ($p<0,05$). As médias de crescimento específico em peso contabilizadas na (**Tabela 9**), demonstraram que as duas últimas concentrações utilizadas no ensaio foram as mais prejudiciais para os alevinos de Tilápia, reforçando o que já havia sido demonstrado no GP.

Tabela 9. Desempenho de alevinos de Tilápia do Nilo submetidos a diferentes concentrações do Piriproxifeno (PPF).

VARIÁVEIS	CONTROLE	PPF 0,4mg/L	PPF 0,8mg/L	PPF 1,2mg/L	PPF 1,8mg/L	CV%
CT	7,27±0,24 ^a	7,55±0,44 ^a	7,33±0,52 ^a	6,74±0,21 ^{ab}	5,88±0,49 ^b	5,25
GP	6,80±0,81 ^a	7,40±1,30 ^a	6,84±1,19 ^a	5,30±1,25 ^a	3,52±0,94 ^b	24,68
CAA	1,20±0,32 ^{cd}	1,36±0,3 ^{bc}	1,22 ±0,29 ^{cd}	1,47±0,38 ^b	5,17±0,42 ^a	17,1
TCE	1,26±0,2 ^a	1,39±0,19 ^a	1,26±0,14 ^a	0,86±0,1 ^b	0,24 ±0,03 ^b	12,6

CT-Comprimento total, Ganho de peso (GP), Conversão alimentar (CA), Taxa de crescimento específico (TCE). Letras iguais indicam não ocorrerem diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos para o teste de Tukey.

4.2. Análise do comportamento locomotor

Os peixes analisados 28 dias após a exposição à substância mostraram redução na distância percorrida dentro do aquário, velocidade média, no parâmetro de trajetória D2P e no parâmetro de mudança angular da trajetória $\Delta\theta$ (Tabela 10).

Tabela 10. Distância percorrida (cm), valores de D2S (cm), D2P (cm), θ (graus), $\Delta\theta$ (graus) e velocidade média (cm/s) do comportamento locomotor de Tilápias controle ou expostas ao Piriproxifeno com 0,8 mg/L e 1,2 mg/L após 28 dias.

28 dias	Distância	D2S	D2P	θ	$\Delta\theta$	Velocidad e
Controle	4164,8 ±991,0 ^a	11,5±4,2	1,7 ± 0,4 ^a	1,0 ± 2,8	-1,0 ± 1,4 ^a	6,9 ± 1,6 ^a
0,8 mg/L	3369,0±593,1 ^{ab}	15,5±2,4	1,4 ± 0,2 ^{ab}	-0,8 ±1,8	0,5 ± 1,1 ^{ab}	5,6 ± 0,9 ^{ab}
1,2 mg/L	2785,8±721,5 ^b	15,9±7,6	1,1 ± 0,3 ^b	1,4 ± 4,0	1,2 ± 0,7 ^b	4,6 ± 1,2 ^b
P	0,039*	0,587	0,019*	0,459	0,013*	0,038*

4.3. Análise histopatológica

O fígado dos peixes controles mostrou estrutura normal para a espécie, como previamente descrito em Vicentini et al., (2005) (Figura 14). Os hepatócitos apresentaram distribuição cordonal formando placas de hepatócitos, apresentando forma arredondada e tamanho normal, com núcleo esférico, central e nucléolo proeminente. Os hepatócitos apresentaram citoplasma claro e rico em lipídios que foram removidos pelo processamento

histológico, aparecendo sem coloração, fundo de luz (coloração negativa). A veia central apresentava aspecto normal, de onde partiam pequenos capilares sinusoides que mantinham contato direto com os hepatócitos.

Estes sinusoides eram abundantes, revestidos por células endoteliais e preenchidos por eritrócitos com coloração levemente eosinófila (avermelhada). Também foi observado tecido pancreático exócrino dentro do fígado, este apresentou organização acinar com grânulos de coloração clara à castanha e localizações difusas no tecido hepático.

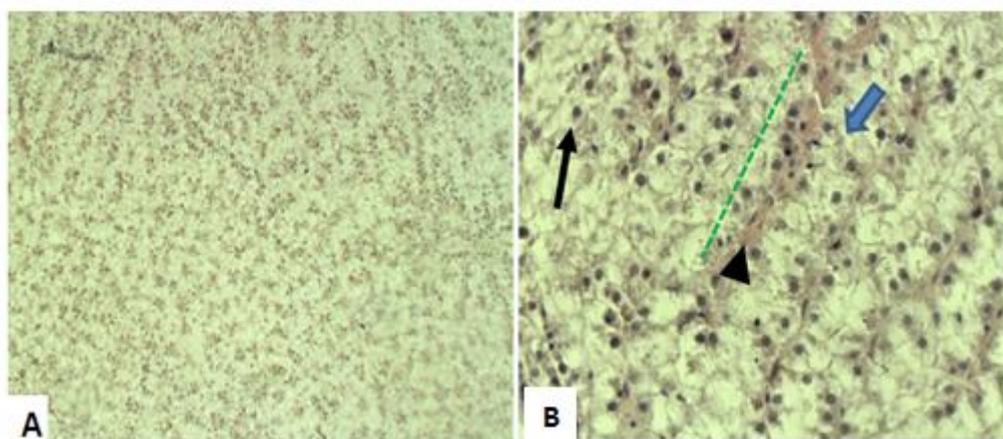


Figura 14. Fotomicrografias do fígado de tilápias do grupo controle (A e B): A) Tecido hepático sem alterações histopatológicas (Controle); aumento 100x. B) Observar arranjo cordonal dos hepatócitos (traço fino verde), núcleo esférico e centralizado (seta); capilar sinusóide hepático (cabeça de seta) e organização em duplo cordão de hepatócitos entre os sinusóides (seta larga azul); aumento 440x.

Os peixes expostos ao PPF com concentração de 0,4mg/L (**Figura 15**) apresentaram alterações morfológicas no fígado. Ocorreram áreas mostrando perda da organização cordonal dos hepatócitos, estes apresentaram núcleo deslocado para periferia, citoplasma mais corado e menos vacuolizado. Os capilares sinusoides apresentaram uma leve congestão e também foram observadas pequenas áreas de infiltrado inflamatório.

A exposição dos animais ao PPF 0,8 mg/L (**Figura 15**) induziu a perda da organização cordonal dos hepatócitos em diversas áreas, com núcleo periférico e maior vacuolização nesses hepatócitos. O parênquima hepático mostrou maior congestão multifocal dos sinusóides e quantidade aumentada de

macrófagos e leucócitos com núcleo muito corado. Também foram observadas áreas de infiltrado inflamatório e fibrose no tecido hepático.

As Tilápias submetidas ao tratamento com o PPF na concentração 1,2 mg/L (**Figura 15**) apresentaram lesões patológicas mais severas, foram observadas áreas de ampla vacuolização dos hepatócitos e muita estase sanguínea no interior dos capilares sinusoides, congestão. Muitos hepatócitos também mostraram núcleo deslocado para periferia celular e perda do arranjo cordonal. Entre os hepatócitos e sinusóides foram observados muitos macrófagos e diversos infiltrados inflamatórios, além de várias áreas de fibrose. Não foi possível mensurar as condições do fígado na concentração de 1,8mg/L devido à alta mortalidade nessa concentração do pesticida.

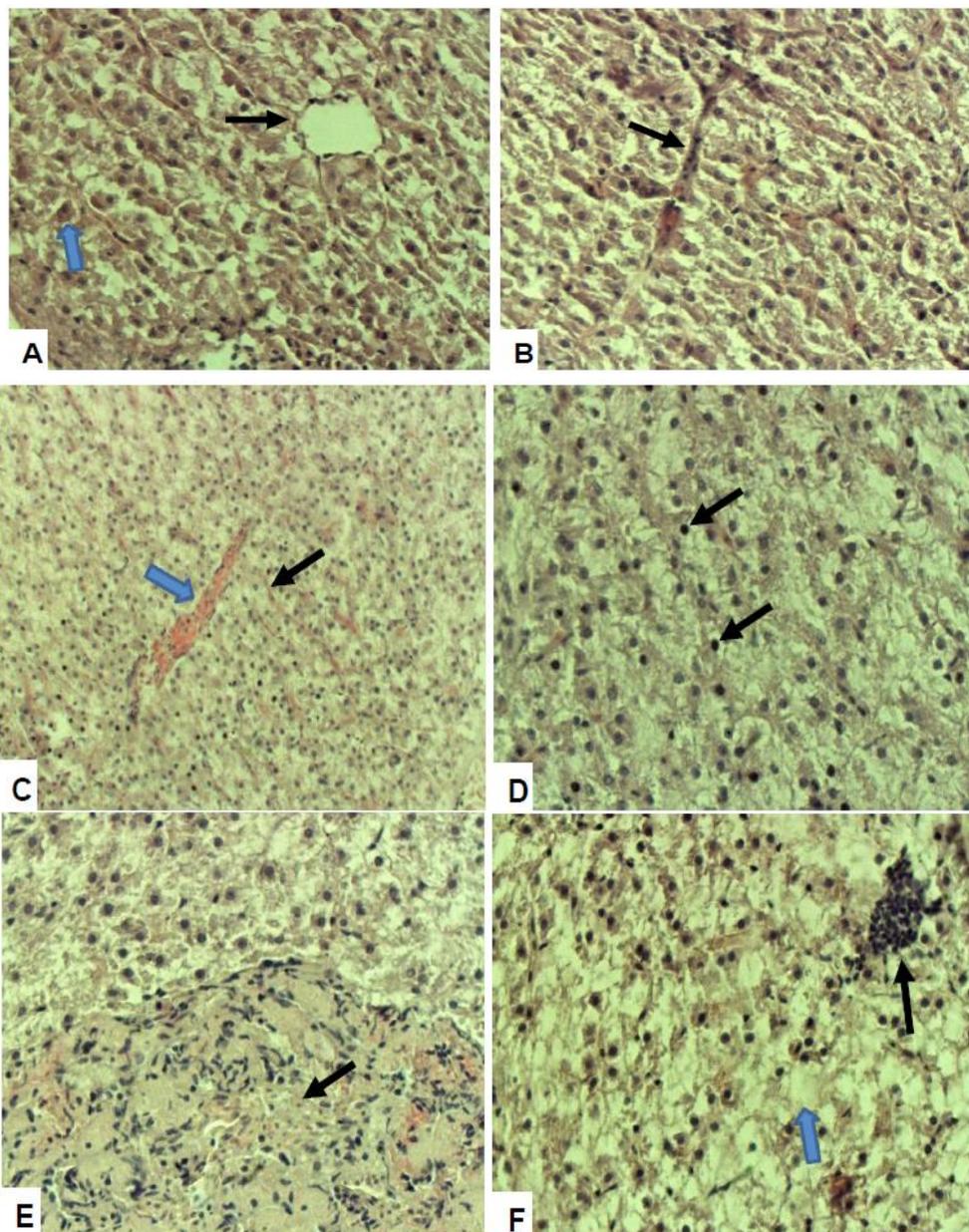


Figura 15. Fotomicrografia do fígado de Tilápias expostas a 0,4 mg/L (A e B); 0,8 mg/L (C e D); e 1,2 mg/L (E e F) do PPF. A) Tecido hepático mostrando a veia central (seta) e hepatócito com núcleo deslocado para periferia; aumento 400x. B) Notar congestão do vaso sinusóide (seta); aumento 400x. C) Veia central em corte longitudinal (seta larga azul) de onde partem os vasos sinusóides em padrão radial (seta); aumento 200x. D) Tecido hepático mostrando maior presença de leucócitos (seta); aumento 400x. E) O fígado também apresentou áreas de fibrose (seta); aumento 400x; F) Infiltrado inflamatório no tecido hepático (seta) e amplas áreas de vacuolização (seta larga azul); aumento 400x.

5. DISCUSSÃO

Alterações histopatológicas semelhantes foram observadas no tecido hepático de *O. niloticus* e *C. carpio* expostas a concentrações sub-letais de carbaril e ciflutrina, respectivamente (MATOS et al., 2007; SEPICI-DINÇEL et al., 2009).

O. niloticus exposta a distintas concentrações de carbaril também mostrou alterações histopatológicas no tecido hepático com diferentes graus de vacuolização celular dos hepatócitos (MATOS et al., 2007). Esta perturbação na estrutura morfológica do fígado poderia estar associada a uma interrupção na função dos tecidos, o que também poderia estar relacionado com a diminuição da capacidade antioxidante.

Informações quanto à toxicidade para organismos aquáticos foram observadas por Truong et al., (2016) que desenvolveram um estudo de toxicidade aguda com embriões de zebrafish encontrando valores de (CE₅₀) de 5,2 µM e animais com efeitos morfológicos adversos e comportamentais. Deste modo, sugerem que a toxicidade do PPF no desenvolvimento dos vertebrados pode não estar limitada somente a insetos.

A toxicidade do PPF também tem sido investigada em copepodos estuarinos como *Eurytemora affinis*, que obteve valor de CL₅₀ após 48h de exposição 73,24µg/L (LEGRAND et al., 2017). Efeitos ecotoxicológicos do piriproxifeno tem sido registrado em organismos não-alvos, microcrustáceos como *Artemia salina* e *Daphnia magna*, mostrando altamente tóxico para ambos (SANTOS et al., 2017).

De acordo com Caixeta et al., (2016), o PPF usado na concentração controle (10 µg/L) para eliminar larvas de *Aedys aegypti* não foi letal para

Xiphophorus maculatus, todavia, os animais expostos a substância apresentaram problemas de comportamento, como natação errática, estresse, perda de equilíbrio e letargia, conforme o incremento das concentrações do larvicida e aumento do tempo de exposição ao produto, fato também observado no presente estudo.

Segundo Dzieciolowska et al., (2017) concentrações mais baixas de PPF (0,005; 0,01; 0,1 µg / ml) não induzem uma diminuição grave da taxa de sobrevivência, nem afeta o desenvolvimento do sistema nervoso central em embriões de zebrafish. Outros estudos com o Metribuzin Fairchild; Sappington (2002) não notificaram efeitos significativos sobre a sobrevivência ou crescimento de bluegill juvenil (*Lepomis macrochirus*) em 75µg/L durante um período de 56 dias.

Apesar dos estudos que relatam efeitos toxicológicos atribuídos à exposição à inseticidas em meio aquático, não há informação aparente disponível sobre o impacto do PPF sobre os peixes larvívoros (SILVA et al., 2016; CAIXETA et al., 2016).

No presente estudo os animais que foram expostos aos níveis mais elevados de PPF apresentaram uma redução nos parâmetros ganho de peso, comprimento total, taxa de crescimento específico e um aumento na conversão alimentar.

Alterações no comportamento alimentar por xenobióticos aquáticos podem ter relação com déficiências no crescimento e ao declínio populacional (WEIS et al., 1999, 2001) Segundo Scott; Sloman (2004), a exposição às substâncias tóxicas pode causar anabolismo proteico em peixe. Uma vez que os animais na tentativa de sair do quadro de estresse, provocado pela exposição ao agente estressor utiliza suas reservas nutricionais em busca da homeostase, resultando na redução do desempenho ou até mesmo a morte dos animais, dependendo do nível do estresse aos quais os animais são expostos.

Pihalova et al., (2012) em estudos com *Danio rerio* submetidos às concentrações de 33 e 53mg/L do Metribuzin em uma exposição subcrônica,

observaram uma diminuição da ingestão de alimentos em comparação ao controle. Em Tilápia, a redução de crescimento e da eficiência alimentar foi descritos no teste de exposição em curto prazo com aflatoxina B1 (AFB1) (em menos de 12 semanas) (CAGAUAN et al., 2004; ZAKI et al., 2008).

Efeito contrário ao obtido no presente estudo foi obtido por Modra et al., (2008), onde não observaram nenhuma diferença significativa no peso corporal de juvenil de carpa comum em 1,75mg/L de metribuzin, após um período de 28 dias de exposição.

No presente estudo os peixes submetidos aos níveis 1,2 e 1,8mg/L apresentaram lesões patológicas mais severas, como demonstra as análises histopatológicas, efeito esse que comprova a redução nos resultados dos parâmetros de desempenho avaliados para estas concentrações de PPF. Sweilum (2006) em seu estudo, avaliando a toxicidade dos pesticidas (dimetoato e metidatião) em juvenis de Tilápia do Nilo em longo prazo (durante 24 semanas), encontrou redução no peso final e taxa de crescimento específico dos peixes com ambos os pesticidas.

Heydarnejad et al., (2013) avaliando o efeito do cádmio em truta arco-íris também observaram efeito significativo, resultando numa diminuição no ganho de peso e crescimento específico e aumento na conversão alimentar aparente no período de 30 dias.

. Pessoa et al., (2011), encontraram diferenças significativas no ganho de peso de *O. niloticus* quando submetidas a 8,3 µg / L de carbofuran em um período de exposição de 96h.

O tecido hepático pode ser considerado um alvo primário de toxicidade de uma substância, portanto, o fígado vem sendo avaliado como órgão biomarcador da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1998). Lesões nos hepatócitos como ampla vacuolização, redução do estoque de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusoides podem ser indicativos de estresse ambiental, sendo inclusive considerados marcadores da qualidade do meio ambiente em que estes animais estão inseridos (TEH et al., 1997).

No presente estudo foi observado que o PPF induziu várias lesões patológicas no fígado dos peixes com severidade dose dependente. Estas lesões podem prejudicar o funcionamento do fígado, podendo repercutir em uma redução da produtividade desses animais, bem como no comprometimento de sua saúde, predispondo ao aparecimento de doenças.

Como o PPF geralmente possui alta propensão à bioacumulação (SULLIVAN; GOH, 2008) estes efeitos adversos causados pelo pesticida tendem a ser mais graves com o passar do tempo, podendo ser particularmente prejudicial a animais adultos que sofreram exposições prolongadas à esse pesticida.

O presente estudo observou um comportamento locomotor reduzido nos animais expostos ao pesticida, isto pode prejudicar a capacidade dos animais se alimentarem, reproduzirem e sobreviverem em ambientes aquáticos (TENORIO et al., 2017). Em trabalhos com *O. niloticus*, Pessoa et al., (2011), observaram uma diminuição evidente na natação dos animais submetidos ao carbofuran em um período de exposição de 96h.

O comportamento integra diversos processos bioquímicos, celulares e sistêmicos que resultam em alterações no organismo como um todo, influenciando na locomoção, alimentação, reprodução e sobrevivência de animais aquáticos (TENORIO et al., 2017). Respostas comportamentais vêm sendo usadas para avaliar alterações toxicológicas em animais aquáticos, inclusive em camarões (GÜNER, 2013). Testes de toxicidade usando alterações comportamentais podem representar uma excelente ferramenta para detectar a toxicidade de contaminantes em animais e efluentes (GARCÍA-DE LA PARRA et al., 2006).

6. CONCLUSÃO

Os animais submetidos às duas maiores concentrações apresentaram os piores desempenhos zootécnicos;

Após 28 dias de exposição, e submetidos às concentrações de 0,8 e 1,2 mg/L de PPF, os alevinos de *O. niloticus* apresentaram comportamento locomotor alterado.

A partir da concentração de 0,4mg/L de PPF ocorreram lesões severas e processos inflamatórios no tecido hepático;

Perspectivas: Neste contexto, tem-se como perspectiva através de novos estudos quantificar o efeito inibitório do PPF em acetilcolinesterase muscular, como também seu efeito sobre enzimas antioxidantes, uma vez que o atual estudo mostra alterações no tecido hepático de animais submetidos ao larvicida.

7. REFERÊNCIAS

- ABNT NBR 15088: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes (Cyprinidae), que revisa a norma ABNT NBR 15088:2011, elaborada pela Comissão de Estudo Especial de Análises Ecotoxicológicas (ABNT/CEE-106). - See more at: <http://www.abnt.org.br/noticias/5079-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-aguda-metodo-de-ensaio-com-peixes-cyprinidae#sthash.imACEKt6.dpuf>, 2016.
- ABE, F. R., COLEONE, A. C., MACHADO, A. A., and Gonçalves Machado-Neto, J. Ecotoxicity and environmental risk assessment of larvicides used in the control of *Aedes aegypti* to *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *J. Toxicol. Environ. Health A* 77: 37–45, 2014.
- ANOGWIH, J. A., SALIU, J. K., LINTON, E. W., MAKANJUOLA, W. A., and CHUKWU, L. O. The compatibility of spindor dust with *Poecilia reticulata* for integrated mosquito larviciding. *J. Clin. Res. Bioethics* 4: 152–157, 2013.
- ANOGWIH, J. A., MAKANJUOLA, W. A., AND CHUKWU, L. O. Potential for integrated control of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using larvicides and guppies. *Biol. Control*. 81: 31–36, 2015.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), 2012.
- AKAISHI, F. 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 contamination and toxicology*, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.
- AKAISHI F. M. - Aplicação de biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo, – Dissertação – Paraná – UFPR, 2003.
- ALPUCHE-GUAL L., GOLD-BOUCHOT G. - Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri* - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (2008) 787–797.

AGRAW. Complete guide to generic pesticides. 2007. Disponível em:
http://www.agrow.com/multimedia/archive/00053/DS258_58994a_53150a.pdf

Acesso em: 18 de maio de 2011.

ARANA, L.V. *Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira*. Florianópolis: Editora da UFSC. 310 p, 2007.

AQUICULTURA NO BRASIL, Série estudos Mercadológicos, IBGE, 2015, pg. 76.

BAR-YAM Y, EVANS D, PARENS R, MORALES AJ, NIJHOUT F. Is Zika the cause of microcephaly? Status Report June 22, 2016. New England Complex Systems Institute (June 22, 2016). Available from:
<http://necsi.edu/research/social/pandemics/statusreport.>, 2016.

BACCARIN, A. E.; CAMARGO, A. F. M. Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, productive performance and carcass characteristics as related to food management. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 16, n. 1-2, p. 125-135, 2004.

BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de Peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria, RS: Editora UFSM 2002.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L., *Bioquímica* 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

BOSCOLO, W.R. Desempenho e Características de Carcaça de Machos Revertidos de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Linhagens Tailandesa e Comum, nas Fases Inicial e de Crescimento. **Rev. bras. Zootec**, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BRABO, M. F. Piscicultura no Estado do Pará: situação atual e perspectivas. *ActaFish*, (2) 1: 1-7, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Cadeia Produtiva da Tilápia*. Brasília, DF: MAPA, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância do câncer ocupacional e ambiental. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011*. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013a.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Censo aquícola nacional, ano 2008*. Brasília: República Federativa do Brasil, 2013b.

BRASIL, Ministério da Saúde. Orientações técnicas para a utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*.

<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/15/Instru—es-para-uso-de-pyriproxifenmaio - PDF>, 2014.

CAIXETA, S. E. et al. Ecotoxicological assessment of pyriproxyfen under realistic exposure conditions of integrated vector management for *Aedes aegypti* control in Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part A, Current Issues, 2016.

CAGAUAN, A.G., TAYABAN, R.H., SOMGA, J.R., BARTOLOME, R.M. Effect of aflatoxin contaminated feeds in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). In: Remedios, R.B., Mair, G.C., Fitzsimmons, K. (Eds.), **Proceedings of the Sixth International Symposium on Tilapia in Aquaculture**, pp. 172–178, 2004.

CARVALHO, A. R. S. Estudo da Biologia da Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1978), proveniente da Bacia do Bacanga, Ilha de São Luís, MA. Monografia (Bacharelado em Ciências Aquáticas com Habilitação em Aqüicultura) –Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2008. 44 p.

CEREJEIRA, M. J; P. VIANA, S. BATISTA, T. PEREIRA, E. SILVA, M. J. VALÉRIO, A. SILVA, M. FERREIRA & A. M. SILVA-FERNANDES. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, 37: 1055-1063, 2003.

CHASIN, A. A. M; LIMA, I. V. Toxicologia para químicos. Minicursos CRQ-IV, 2010. Disponível em:

<http://www.crq4.org.br/sms/files/file/toxicologia_mini2010.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2013.

DARRIET, F; MARCOMBE, S; ETIENNE, M; YÉBAKIMA, A; AGNEW, P; YP-TCHA, M; CORBEL, V. Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). *Parasites & Vectors* 3, 2010.

DOMINGOS, F. X. V. Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes. Universidade Federal do Paraná, 2006.

DIEMER, O.; NEU, D.H.; FEIDEN, A.; LORENZ, E.K.; BITTENCOURT, F.; BOSCOLO, W.R. Dinâmica nictimeral e vertical das características limnológicas em ambiente de criação de peixes em tanques-rede. *Ciência Animal Brasileira*, v.1 1, n. 1, p. 24-31, 2010.

DZIECIOLOWSKA, S.; LARROQUE, A.L.; KRANJEC, L.A.; DRAPEAU, P.; SAMARUT, E. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. *Scientific Reports* | 7:40067 | DOI: 10.1038/srep40067, 2017.

EBC - Empresa Brasil de Comunicação S/ - Agência Brasil. RS suspenso uso de larvicide Pyriproxyfen no combate do mosquito *Aedes* [Internet]. 2016 [cited 2016 April 25]. Available from: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-02/rs-suspendelarvicidapyriproxyfen-usado-em-caixas-dagua-para-combater-aedes>.

ECHANIZ, S.; VIGNATTI, A. Determinación del estado trófico y de la capacidad de carga de embalse casa de piedra. *BioScriba*, v. 2, n. 1, p. 41-51, 2009.

EVANS D, NIJHOUT F, PARENS R, MORALES AJ, BAR-YAM Y. A possible link between pyriproxyfen and microcephaly [Internet]. Report No biorxiv; 048538v1. 2016 [cited 2016 May 4]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/048538>.

FANTA, E. et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.54, n. 2, p. 119-130, 2003.

FAO – Food and Agriculture Organization, of the United Nations. *The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges*. Roma: FAO, 2014a.

FAO – Food and Agriculture Organization, of the United Nations. *Fishery and aquaculture statistics 2012*. Roma: FAO yearbook, 2014b.

JIN, X.; XU, Q.; HUANG, C. Current status and future tendency of lake eutrophication in China. *Science in China. Series C, Lifes Sciences*, (48) 948-954, 2005.

FITZSIMMONS, K. Tilapia: most important aquaculture species of the 21st century. In: PROCEEDINGS FROM THE FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 2000, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro, 2000. p. 3-8.

FIGUEIREDO, H.C. P.; LEAL, C.A.G. Certificação sanitária na aquicultura. *Panorama da Aqüicultura*, v.18, n.107, p.14-20, 2008.

FLAMMARION, P. et al. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 51, n. 2, p. 145-153, 2002.

FREIRE, M. M. Determinação de metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em biles de peixes como biomarcador na Baía de Guanabara. Rio de Janeiro, 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

GARCÍA DE- LA PARRA, L.M., BAUTISTA-COVARRUBIAS, J.C., RIVERA-DE LA ROSA, N., BETANCOURT, L. M., GUILHERMINO, L. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65:372–380, 2006. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.09.001.

GONÇALVES A. A. (Org.), (*Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação*). São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

GUO, L.; LI, Z. Effects of nitrogen and phosphorus from fish cage-culture on the communities of a shallow lake in middle Yangtze river basin of China.

Aquaculture, Amsterdam, 226: 201-212, 2003.

GUO, L.; LI, Z.; XIE, P; NI, L. Assessment effects of cage culture on nitrogen and phosphorus dynamics in relation to fallowing in a shallow lake in China.

Aquaculture International, New York, 17: 229-241, 2009.

GUARINO, A.W.S.; BRANCO, C.W.C.; DINIZ, G.P.; ROCHA, R. Limnological characteristics of an old tropical reservoir (Ribeirão da Lages Reservoir, RJ, Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, Botucatu, 17(2): 129-141, 2005.

GUNER, U. Behavioral Changes Induced by Neonicotinoid insecticide Acetamiprid in 387 freshwater shrimp (*Caridinanilota*). **J. Anatol. Nat. Sci**, 4:6-10, 2013.

GRAZZIERO, D.L.P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. *Planta Daninha*, v.33, p.83-92, 2015.

GRISOLIA, C.K. *Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução*. Brasília: Universidade de Brasília, 2005. 392p.

HERMES-LIMA M., STOREY J.M., STOREY K.B. Chapter 20 Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. pp. 263-287 in K.B. Storey, J.M. Storey editors. *Cell and Molecular Response to Stress*. Elsevier, 2001.

HERMES, C.A. Sistema agroindustrial da tilápia na região de Toledo-PR e comportamento de custos e receitas. Tese de Doutorado em Aquicultura. Jaboticabal: UNESP, 2009. 106 p.

HEYDARNEJAD, M. S.; KHOSRAVIAN-HEMAMAIL, M.; NEMATOLLAHI, A. Effects of cadmium at sub-lethal concentration on growth and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Irish Veterinary Journal**, v.66, n.11, p.1-7, 2013.

JIN, X.; XU, Q.; HUANG, C. Current status and future tendency of lake eutrophication in China. *Science in China. Series C, Life Sciences*, (48) 948-954, 2005.

KATAGI, T., TAKAHASHI, N. *Hydrolysis of S-31183 in Buffered Aqueous Solutions*. Sumitomo Chemical Company, 1994.

KUMAR, A.; RAI, D.K.; SHARMA, B.; PANDEY, R.S. k-cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 93, p. 96–99, 2009.

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

KUBITZA, F., CAMPOS, J. L., ONO, E. A. & ISTCHUC, P. I. Panorama da piscicultura no Brasil. Espécies cultivadas, sistemas de produção, perfil tecnológico e de gestão e os principais canais de mercado da piscicultura. *Panorama da Aquicultura*, 22 (133): 16-31, 2012b.

LONDRES, F. *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. Rio de Janeiro: ASPTA, 190p, 2011.

LINS, J.A.P.N.; KIRSCHNIK, P.G.; QUEIROZ, V.S.; CIRIO, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para o monitoramento de ambientes aquáticos. *Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambiental*, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 469-484, 2010.

LEITE, E. M. A.; AMORIM, L. C. A. *Toxicologia geral*. Nota de aula, Faculdade de Farmacia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. Disponível em: <<http://www.farmacia.ufmg.br/lato/Apostila%20Toxicologia%20Geral%20.doc>>. Acesso em: 03 abr. 2013.

LEGRAND, E.; BOULAN-GÉLECOMTE, C.; RESTOUX, G.; TRÉMOLET, G.; DUFLOT, A.; FORGET-LERAY, J. Individual and mixture acute toxicity of model pesticides chlordecone and pyriproxyfen in the estuarine copepod *Eurytemora*

affinis. Environ Sci Pollut Res (2017) 24: 5976. doi:10.1007/s11356-016-8294-5, 2017.

LEHNINGER, A. L. Lehninger princípios de bioquímica. 4 ed. São Paulo: SARVIER. 2006.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) A bacia do rio Tibagi.Londrina: Cap. 29, p. 551 – 577, 2002.

MARTINS, T.E.P. Estudo comparativo da atividade catalítica e expressão protéica do citocromo P4501A (CYP1A) em cascudos (Loricariidae) e tilápias (Cichlidae). Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

MATOS, P., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., PEIXOTO, F., CARROLA, J., ROCHA, E. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 89, 73–80, 2007.

MEURER, F.; BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; FORNARI, D. C. Grau de moagem dos alimentos em rações para a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante o período de reversão sexual. Acta Scientiarum. Animal Sciences, v.27, n.1, p.81-85, 2005.

MEOLA, R., MEIER, K., DEAN, S., BHASKARAN, G. Effect of pyriproxyfen in the blood diet of cat fleas on adult survival, egg viability, and larval development. J. Med. Entomol. 37, 503–506, , 2000.

MODRA. H; HALUZOVA. I; BLAHOVA. J. *et al.*, “Effects of subchronic metribuzin exposure on common carp (*Cyprinus carpio*)” **Neuroendocrinology Letters**, vol. 29, no. 5, pp. 669–674, 2008.

MORGAN, M.J., KICENIUK, J.W. Effect of fenitrothion on the foraging behavior of juvenile atlantic salmon. Environmental Toxicology and Chemistry 9, 489–495, 1990.

MOZETO, A.A., ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente e. In: ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações. (eds) São Carlos, Rima Editora: 15 – 38, 2006.

MONSERRAT, J.M., GERACITANO, L.A., PINHO, G.L.L., VINAGRE, T.M., FALEIROS, M., ALCIATI, J.C. & BIANCHINI, A. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe (III) xylenol orange complex formation. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 45, 177–183. 2003.

NAYAR. J. K; ALI A. and M. ZAIM: *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 18, 196–201, 2002.

NASR, M. H. et al. Biomarker Response and Biomass Toxicity of Earthworms *Aporrectodea caliginosa* Exposed to IGRs Pesticides. *Environmental & Analytical. Toxicology*, 2015.

OMS. The World Health Report 2000. Geneva: WHO; 2000.

ONO, E. A. Criação de peixes em tanques-rede. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COOTECNIA – ZOOTEC, Campo Grande, 2005. Anais eletrônicos... Campo Grande: ABZ, 2005. Disponível em: <www.abz.org.br/files.php?file=documentos/Eduardo_260341900.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2012.

PEREIRA, B. B; De CAMPOS JÚNIOR, E. O. Enzymatic alterations and genotoxic effects produced by sublethal concentrations of organophosphorous temephos in *Poecilia reticulata*. *J.Toxicol. Environ. Health A* 78: 1033–1037, 2015.

PESSOA P. C., et al. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquatic Toxicology* 105, 312– 320, 2011.

PLHALOVA L.; STEPANOVA S.; PRASKOVA E.; CHROMCOVA L.; ZELNICKOVA L.; DIVISOVA. L.; SKORIC M.; PISTEKOVA V.; BEDANOVA I.; SVOBODOVA Z;. The Effects of Subchronic Exposure to Metribuzin on *Danio rerio*. **The Scientific World Journal**, Article ID 728189, 6 pages

doi:10.1100/2012/728189, volume. 2012.

RIGOTTO, R.M.; VASCONCELOS, D.P.; ROCHA, M.M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Cad. Saúde Pública.*, v.30, p.1-3, 2014.

RICHARDSON, J.S.; ZHANG, Y.; MARCZAK, L.B. Resource subsidies across the land-freshwater interface and responses in recipient communities. *River Research and Applications*, (26): 55-66, 2010.

RIDDIFORD, L. M. Prevention of metamorphosis by exposure of insect eggs to juvenile hormone analogs. *Science* 167, 287–288, doi: 10.1126/science.167.3916.287, 1970.

RODRÍGUEZ-FUENTES,G.; GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine Environmental Research*, v. 58, p. 505–509, 2004.

RODRIGUES, S. R. et al. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 99, n. 2, p. 181-188, 2011.

SANDAHL, J. F., BALDWIN, D. H., JENKINS, J. J., SCHOLZ, N.L. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 136–145, , 2005.

SANTOS, V. B. Crescimento morfométrico e alométrico de linhagens de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Minas Gerais, 2004. 86 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, 2004.

SANTOS, E.L.; SILVA, F.C.B.; PONTES, E.C. *et al.* Resíduo do processamento do extrato de própolis vermelha em ração comercial para alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) *Comunic. Scient.*, v.4, p.179-185. 2013.

SANTOS, V. S. V., CAIXETA, E. S., CAMPOS-JUNIOR, E. O., PEREIRA, B. B. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on

nontarget organisms: Redefining the use of pyriproxyfen. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**,

<http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2016.1266721>, 2017.

SEPICI-DINÇEL, A., et al. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1433-1439, 2009.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, 2009.

SILVA, S. V. S., DIAS, A. H. C., DUTRA, E. S., PAVANIN, A. L., MORELLI, S., and PEREIRA, B. B. The impact of water pollution on fish species in southeast region of Goiás, Brazil. *J. Toxicol. Environ. Health A* 79: 8–16, 2016.

SOUZA, R.S. et al. Trace elements in the water and fish of tropical watercourses in central Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 42, n. 3, 2016.

SULLIVAN, J. Environmental fate of pyriproxyfen. California Department of Pesticide Regulation, 2000.

SULLIVAN, J., GOH, K. Environmental fate and properties of Pyriproxyfen. *J. Pest. Sci.* 33, 339–350, , 2008.

SKLAN, D.; PRAG, T.; LUPATSCH, I. Structure and function of the small intestine of the tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (Teleostei, Cichlidae). *Aquaculture Research*, v. 35, p. 350-357, 2004.

SPALDING, R. F., M. E. EXNER, D. D. SNOW, D. A. CASSADA, M. E. BURBACH; S. J. MONSON. Herbicides in ground water beneath Nebraska's management systems evaluation area. *Journal of Environmental Quality*, 32: 92-98, 2003.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v.68, p.369-392, doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.016, 2004.

SWEILUM, M .A. Effect of sublethal toxicity of some pesticides on growth parameters, haematological properties and total production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and water quality of ponds. **Aquaculture Research**, v.37, pag.1079-1089, doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01531.x, 2006.

TENORIO, B. M.; et., al. Can fractal methods applied to video tracking detect the effects of deltamethrin pesticide or mercury on the locomotion behavior of shrimps?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, (*In prelo*), 2017.

TEH, S. J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D. E. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, 37, 51-70, 1997.

TUNDISI, J.G. e MATSUMURA-TUNDISI, T. *Limnologia*. São Paulo: Oficina de Textos. 631p, 2008.

TUNDISI, J.G. Gerenciamento integrado de bacias hidrográficas e reservatórios estudos de caso e perspectivas. *In*: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata*. São Carlos: Rima. p. 1-21, 2005.

TRAYLER, K.M.; DAVIS, J.A. Sensitivity of *Daphnia carinata* Sensu Lato to the Insect Growth Regulator, Pyriproxyfen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 33, p.154–156, 1996.

TRUONG et al. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environmental Pollution*, V. 218, November, Pages 1089–1093, 2016.

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

VAN DER OOST R, BEYER J, VERMEULEN N P E,. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57–149, 2003.

VICENTINI, C.A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I.B.; BOMBONATO, M.T.S.; BERTOLUCCI, B.; LIMA S.G.; SANTOS, A.S. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Morphology**, 23(3), 211-216, 2005.

VENTURA, A. L., P. A. ABREU, R. C. FREITAS, P. C. SATHLER, N. LOUREIRO AND H. C. CASTRO. "Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação ea relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo:[revisão]." *Rev. psiquiatr. clín.* **37**(2): 66-72, 2010.

WANG, J., KRAUSE, R., BLOCK, K., MUSAMEH, M., MULCHADANII, A. E., SCHONING, M.J. Flow injection amperometric detection of OP nerve agent based on an organophosphorus-hydrolase biosensor detector. *Biosensors and Bioelectronics*, 18: 255-260, 2003.

WANG, C.-Y., TENG, H.-J., LEE, S.-J., LIN, C., Wu, J.-W., and Wu, H.-S. Efficacy of various larvicides against *Aedes aegypti* immatures in the laboratory. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66: 341–344, 2013.

WEIS, J.S., SMITH, G.M., ZHOU, T. Altered predator/prey behavior in polluted environments: implications for fish conservation. *Environmental Biology of Fishes* 55, 43–51, 1999.

WEIS, J.S., SAMSON, J., ZHOU, T., SKURNICK, J., WEIS, P. Prey capture ability of mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) as a behavioral biomarker for contaminants in estuarine systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1442–1452, 2001.

WHEELER, D. E. & NIJHOUT, H. F. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. *Bioessays* **25**, 994–1001, doi: 10.1002/bies.10337, 2003.

WHO - World Health Organization. *Pyriproxyfen in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers*
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/pyriproxyfenvector.PDF, 2007, 25/08/2016.

WHO - World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality: second addendum to third edition. Available from:

http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/secondaddendum20081119.PDF, 2008.

WHO - World Health Organization, 2009. Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control—New edition. Geneva, Switzerland.WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.

WHOPES - World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme.

WHOPES-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae <http://www.who.int/whopes/quality/newspecif/en/> (2012) (20/08/2016).

ZAKI, M.S., SHARAF, N.E., RASHAD, H., MASTALA, S.O., FAWZ, Q.M.

Diminution of aflatoxins in tilapia nilotica fish by dietary supplementation with fish meal and nigella sativa oil. *Am. -Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 3, 211-215, 2008.

ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species predictive value for mammals. *Toxicology. Limerick* 129: 63-71, 1998.