



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**  
**E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**WAGNER DOS SANTOS MARIANO**

**EFEITOS DE BIOPESTICIDA A BASE DE *Bacillus thuringiensis* NA HISTOLOGIA E FISIOLOGIA DE *Piaractus mesopotamicus* E *Arapaima gigas*.**

**MACAPÁ**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE**  
**E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**WAGNER DOS SANTOS MARIANO**

**EFEITOS DE BIOPESTICIDA A BASE DE *Bacillus thuringiensis* NA HISTOLOGIA E FISIOLOGIA DE *Piaractus mesopotamicus* E *Arapaima gigas*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade Federal do Amapá (área de concentração: Biodiversidade e Conservação), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Tavares Dias

MACAPÁ

2017

## Ficha Catalográfica

MARIANO, Wagner dos Santos Mariano.

Efeitos de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* na histologia e fisiologia de *Piaractus mesopotamicus* e *Arapaima gigas*/ Wagner dos Santos Mariano. – Macapá: UNIFAP, 2017.

84 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Amapá. 2017.

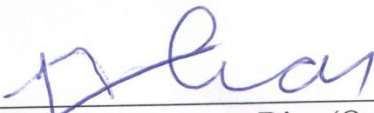
1. Ictiologia. 2. Hematologia. 3. Bioquímica. 4. Hispatologia.

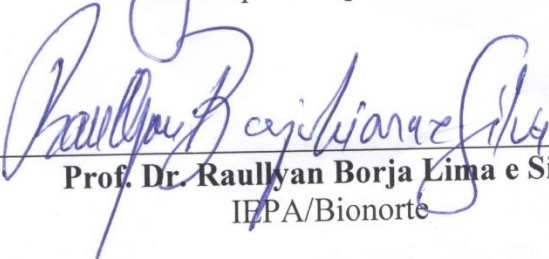
WAGNER DOS SANTOS MARIANO

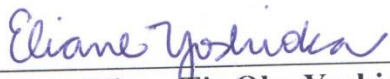
**Efeitos de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* na histologia e fisiologia de *Piaractus mesopotamicus* e *Arapaima gigas***

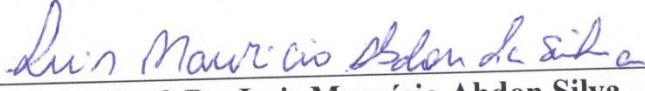
Macapá, AP, em 21/02/2017

Banca Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Marcos Tavares Dias** (Orientador)  
Embrapa Amapá/Bionorte

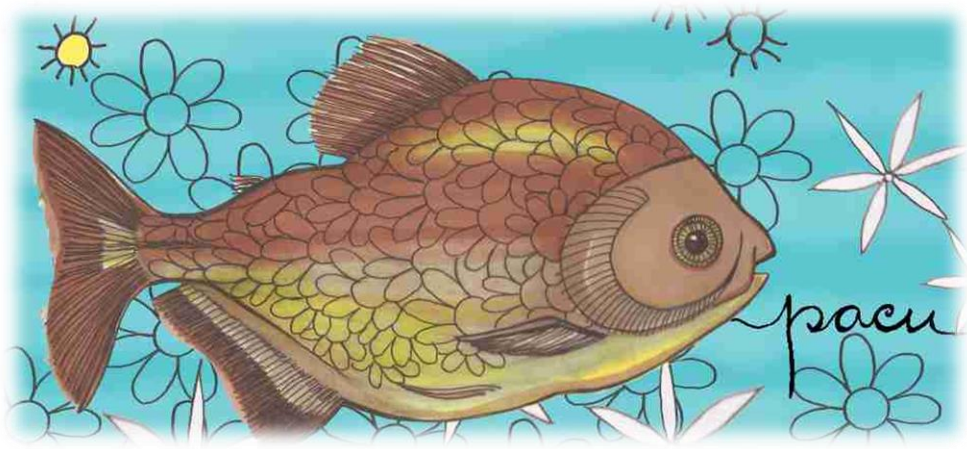
  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Raullyan Borja Lima e Silva**  
IEPA/Bionorte

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka**  
Embrapa Amapá

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Luis Maurício Abdon Silva**  
IEPA

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dra. Marcela Videira**  
UEAP

C



*Uso a palavra para compor meus silêncios.*

*Mancel de Barros*



Dedico em primeiramente a Jesus Cristo, PAI CELESTIAL, que me dotou de sabedoria. A Maria, Mãe de Jesus e minha constante intercessora. Aos meus pais: *Claudio Mariano & Tereza dos Santos Mariano*, que me deram a vida, amor e são os verdadeiros motivos das minhas lutas e conquistas.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, grande responsável por tudo isso.

Aos meus pais, Claudio & Tereza, que não puderam dividir em vida comigo esse sonho, mas que mesmo no plano espiritual tem me fortalecido, me guiado e derramado amor em minha vida. Muita saudade, é para vocês meus amores.

Ao *Dr. Marcos Tavares Dias*, pela oportunidade de realizar um dos sonhos mais importantes da minha vida – tornar-me DOUTOR. Obrigado por socializar a sua vasta sabedoria sobre ictiologia, com gentileza e dedicação. Tenho muito orgulho de ter sido orientado por uma das autoridades em hematologia e parasitologia de peixes do Brasil. Meu sincero agradecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-BIONORTE). Inicialmente a coordenação do programa da UNIFAP que sempre me ajudaram, mesmo à distância, em todas as minhas demandas discentes. Agradeço também a Coordenação geral da Bionorte em Manaus, em especial ao *Prof. Spartacos* e *Profa. Isabel Pontes* que sempre foram gentis e solícitos.

A Universidade Federal do Tocantins, Campus universitário de Araguaína, meu local de trabalho “a firma”, através dos gestores Prof. Dr. Bovolato, diretor do campus na maioria do tempo em que estive no doutorado e atual vice-reitor, e Profa. Dra. Domenica Palomaris coordenadora do curso de biologia, que sempre compreenderam minhas ausências necessárias.

AO MEU AMOR, aquele que esteve, está e sempre estará em minha vida, nos meus projetos e “nossos” sonhos. Obrigado por aceitar minhas ausências, meus surtos de mau humor, limpar minhas lágrimas e colocar em meu rosto sorrisos, além das comidinhas Deeliciosas. Te amo *Eltongil* (Sweet).

Aos meus familiares, que estão em Campo Grande (MS), sempre torcendo por mim e vibrando com minhas conquistas. Vocês fazem minha vida mais alegre e colorida, *Juraci* (Jura), *Marcelo* (Mucilon), *Claudia* (Taldanha), *Elaine* (Elô ou Lorraine), *Carlos* (Cu), *Lucas* (Luquinhas), *Amanda* (Mandica), *Maria Eduarda* (Madu), *Maria Tereza* (Matê). Amo vocês!

Não posso esquecer-me da GRANDE FAMÍLIA DOS SANTOS, LINDA E BARULHENTA, *Vovó Clarinda* (Dona Candinha) meus tios e primos. Amo vocês.

A minha sogra, Dona Olga, que me adotou como filho após a partida dos meus velhos para os braços do pai. Obrigado Dona Marolga, amo a senhora.

As minhas cunhadas, Viviane (Vivi) e Cristiane (Tatinha), por me darem força nos momentos difíceis e compartilharem comigo bons momentos de alegria.

Ao meu AMIGO/IRMÃO – *Dr. Gecilane Ferreira* - que conheci no dia 15 de janeiro de 2010, quando cheguei na UFT e de lá pra cá mostrou que irmãos não são só aqueles que possui o nosso sangue e sim aquele que chega em seu coração e se instala pra sempre. Obrigado Gê.

Ao meu Primo Irmão *Alexandre Salicano* (Xande), eu e você sempre estivemos juntos, mesmo com as distâncias geográficas e aéreas (risos), e sempre estaremos, obrigado por habitar em meu coração, na minha vida e nas nossas aventuras.

As minhas amigas lindas do colegiado e da vida, *Dra. Domênica* (chefa), *Dra. Roberta* (Robertinha do Recife) e *Dra. Karoline* (Karol comKa). Obrigado pelo apoio durante o doutorado, beijos queridas.

Ao professor *Dr. Sandro Estevan Moron*, por me autorizar usar o seu laboratório, disponibilizar os peixes e tirar dúvidas ictiológicas. Obrigado Sandrito.

Aos meninos e meninas, meus FILHOS, do PET CIÊNCIAS NATURAIS, que cooperaram durante esses quatro anos e aceitaram minhas ausências: pra cursar disciplinas, fazer experimentos e escrever tese. Vocês são os melhores!

Aos meninos que me ajudaram no Experimento: Helen, Mellis, Lucas, Bethy e a Técnica do laboratório Liana, sem vocês essa pesquisa não seria possível.

Ao Jefferson e Marcela (ex-alunos e mestrandos) que estiveram comigo nos experimentos e dividiram árdua tarefa de iniciação as análises histológicas, vocês são ótimos e contem sempre comigo.

Aos Professores membros da banca, na qualificação e defesa, que ajudaram aparar as arestas. Obrigado pelas excelentes contribuições.



Agradecimento especial a minha amiga e excelente pesquisadora Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka, com ela aprendi os ofícios da bancada que levo para minha vida de professor e pesquisador.

A todos, que contribuíram direta e indiretamente para desenvolvimento do meu trabalho, agradeço.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	01
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	05
PESTICIDAS OU AGROTÓXICOS	05
<i>Bacillus thuringiensis</i> (bacillaceae) NA AGRICULTURA	07
IMPACTOS DOS PESTICIDAS E BIOPESTICIDAS NA AQUICULTURA	10
O USO DE PESTICIDAS NA PISCICULTURA	12
EFEITOS FISIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE PESTICIDAS EM PEIXES	14
OS PEIXES ALVOS DESTE ESTUDO	16
<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887	16
<i>Arapaima gigas</i> Schinz, 1822	18
<b>REFERÊNCIAS</b>	19
<b>ARTIGO I – PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DE <i>Arapaima gigas</i> (ARAPAIMIDAE) EXPOSTO A BIOPESTICIDA A BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i>.</b>	31
<b>INTRODUÇÃO</b>	31
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	34
PROCEDIMENTO DE ADIÇÃO DO BIOPESTICIDA DIPEL®-WP NA ÁGUA E DIETA de <i>Arapaima gigas</i>	35
PROCEDIMENTOS DE ANÁLISES SANGUÍNEAS	36
ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	37
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
<b>RESULTADOS</b>	38
<b>DISCUSSÃO</b>	51
<b>CONCLUSÕES</b>	57
<b>REFERÊNCIAS</b>	57
<b>ARTIGO II – PARÂMETROS FISIOLÓGICOS de <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Osteichthyes:Serassalmidae) EXPOSTO A BIOPESTICIDA A BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i></b>	63

<b>INTRODUÇÃO</b>	65
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	66
PREPARAÇÃO DAS DIETAS CONTENDO O BIOPESTICIDA A BASE DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	66
PROCEDIMENTO DE ADIÇÃO DO BIOPESTICIDA DIPEL®-WP NA ÁGUA E DIETA de <i>Arapaima gigas</i>	67
PROCEDIMENTOS DE ANÁLISES SANGUÍNEAS	68
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	68
<b>RESULTADOS</b>	69
<b>DISCUSSÃO</b>	74
<b>CONCLUSÕES</b>	76
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	79

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

GC – Grupo controle

GE – Grupo experimental

DDT – Diclorodifeniltricloetano

Cry – Proteína sintetizada pela bactéria *Bacillus thuringiensis*, também conhecida por *δendotoxinas*

AST – Aspartato Amino Transferase ou Aminotransferase de Aspartate

ALT – Alanina Amino Transferase ou Aminotransferase de Alanine

DIPEL – Biopesticida industrializado à base de *Bacillus thuringiensis*

RBC – Contagem de Eritrócitos

VCM – Volume Corpuscular Médio

HCM – Hemoglobina Corpuscular Médio

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

nm – Nanômetro

μL – Microlitro

fL – Fentolitro

g/dL – grama por decilitro

mg/L – miligrama por litro

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

- Tabela 1.** Mortalidade de *Arapaima gigas* durante e após exposição ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 39
- Tabela 2.** Parâmetros hematológicos em *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 40
- Tabela 3.** Trombograma e leucograma de *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 41
- Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos plasmáticos de *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 42
- Tabela 5.** Frequência das alterações histopatológicas no fígado de *Arapaima gigas* exposto a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 44
- Tabela 6.** Frequência das alterações histopatológicas no rim de *Arapaima gigas* exposto a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 47
- Tabela 7.** Estruturas intestinais em *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 49

### ARTIGO II

- Tabela 1.** Mortalidade de *Piaractus mesopotamicus* durante e após exposição ao biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. 69
- Tabela 2.** Parâmetros hematológicos em *Piaractus mesopotamicus* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 70
- Tabela 3.** Trombograma e leucograma de *Piaractus mesopotamicus* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 71
- Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos plasmáticos de *Piaractus mesopotamicus* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. 72

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** *Bacillus thuringiensis* cultivado a 35°C em estufa microbiológica por 24 horas a partir do biopesticida DiPel®) em ágar Mueller Hinton, corado através da técnica de Gram, observado em microscopia de luz. 07
- Figura 2.** Morfologia dos cristais de *Bacillus thuringiensis*. (A) Bipiramidal Cubóide. Fonte: Gusmão, F.P. (2013). 08
- Figura 3.** Desenho esquemático representando a ação do biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. A – Inseto se alimentando de folhas contendo o biopesticida; B- Ação dos Biopesticidas nas células do epitélio intestinal de larvas de insetos. Fonte: Camila Pereira dos Santos (2015). 11
- Figura 4.** Esquema que ilustra a dinâmica dos biopesticidas no meio ambiente, adaptado de Benzi, T.P. (2013). 13
- Figura 5.** Espécime de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Ilustração: Mário Júnior Saviato (2016). 16
- Figura 6.** Pirarucu *Arapaima gigas*. Ilustração: Mário Júnior Saviato (2016). 17
- Figura 7.** Desenho esquema representando o carregamento dos biopesticidas a base de *Bacillus thuringiensis* para ambientes aquáticos, sinalizando para a falta de informações sobre o que acontece com organismos aquáticos se ingerirem essa bactéria. Fonte: Camila Pereira dos Santos (2015). 19

### ARTIGO I

- Figura 1.** Concentração plasmática de cortisol, lactato e glicose em *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. As barras verticais são médias e as linhas verticais associadas às barras representam Desvio Padrão. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com ANOVA seguido do pós-teste Dunnett. 43
- Figura 2.** Índice de alteração histopatológica (IAH) e valor médio de alteração (VMA) no fígado de *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. As barras verticais são médias e as linhas vertical associadas às barras representam desvio padrão. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), e acordo ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. 45
- Figura 3.** Alterações histopatológicas no fígado de *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. (A) controles, sem alterações expressivas – sinusóides (área circular) e veia central (seta preta). (B) fígado de peixes expostos a água contendo biopesticida, após 24 horas, apresentado 46

núcleos localizados na periferia da célula (área circular) e células com vacuolização nuclear (seta branca). (C) fígado de peixes alimentados com dieta contendo biopesticida, após 48 horas, apresentando células com ausência de nucléolo e estagnação biliar (área quadriculada). (D) fígado de peixes alimentados com dieta contendo biopesticida, após 48 horas, apresentando células com hipertrofia nuclear (setas vermelhas), atrofia nuclear (setas amarelas) e vacuolização citoplasmática nos hepatócitos. Aumento de 400x (A) e aumento de 1000x (B, C e D). Coloração: Hematoxilina e Eosina.

**Figura 4.** Índice de alteração histopatológica (IAH) e valor médio de alteração (VMA) no rim de *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. As barras verticais são médias e as linhas vertical associadas às barras representam desvio padrão. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), e acordo ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett. 48

**Figura 5.** Alterações histopatológicas no rim de *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. (A) peixes controles: tecido renal sem alterações morfológicas expressivas, glomérulos (seta preta). (B) hipertrofia nuclear (seta preta) e dilatação dos capilares (seta branca) em peixes expostos ao biopesticida na água, após 24 horas. (C) área com presença de centros de melanomacrófagos em peixes expostos ao biopesticida na água, após 48 horas. (D) redução da capsula de Bowman (seta preta) em peixes expostos ao biopesticida na água, após 24 horas. (E) oclusão da luz tubular (seta preta) e estreitamento da luz tubular (seta branca) em peixes expostos ao biopesticida na água, após 48 horas. (F) necrose (estrelas) em peixes alimentados com dieta contendo biopesticida na água, após 24 horas. Aumento de 400x (A, B, C, D, E e F). Coloração: Hematoxilina e Eosina. 48

**Figura 6.** Alterações histopatológicas no intestino de *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. A – Grupo controle: Epitélio Intestinal, vilosidades verticais. B) Grupo Água 48 horas: Vilosidades verticais - Setas indicam as alterações na espessura da mucosa intestinal. C) Intestino de peixes que receberam dieta contendo biopesticida, após 48 mostrando camada muscular (CM), submucosa (SB), lâmina própria (LP), vilosidades horizontais (seta) e vilosidades verticais (circulo). D) Grupo Ração 48 horas: Células do epitélio intestinal, mostrando a presença de células caliciformes (\*). E) Grupo Água 24 horas: epitélio intestinal mostrando a presença de linfócito (seta). Coloração: Hematoxilina e Eosina. 50

## ARTIGO II

**Figura 1.** Concentração plasmática de cortisol, lactato e glicose em *Piaractus mesopotamicus* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. As barras verticais são médias e as linhas verticais associadas às barras representam Desvio Padrão. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com ANOVA seguido do pós-teste Dunnet. 73

## RESUMO

Os biopesticidas são utilizados na agricultura no combate de pragas em substituição aos pesticidas químicos, com a premissa de não causarem problemas ambientais e a organismos não-alvos. Porém, em vertebrados, as informações sobre os efeitos do biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* são reduzidas. O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos de biopesticida à base de *B. thuringiensis*, quando adicionado na água dos tanques e na alimentação, na histologia (rim, fígado e intestino) e fisiologia de *P. mesopotamicus* e *A. gigas*, por 24 e 48 horas. Para os ensaios foi utilizada, a variedade *B. thuringiensis* var. *kurkaki* que contém esporos dessa bactéria. Foi adicionado 0,13 g desse biopesticida em cada kg de ração comercial nos protocolos de dieta contendo o biopesticida. Para os grupos que foram submetidos ao biopesticida diretamente na água dos tanques foi adicionado 20 mg do biopesticida para cada litro de água (20 mg/L). *Arapaima gigas* e *P. mesopotamicus* submetidos a *B. thuringiensis* apresentaram ajustes fisiológicos caracterizados por alterações (aumentos ou reduções) no eritrograma (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos), trombograma, leucograma, perfil bioquímico plasmático (sódio, cloreto, potássio, colesterol, glicose, triglicerídeos, cortisol proteínas totais) e enzimático (Aspartato Amino Transferase e Alanina Amino Transferase). Em *A. gigas* houve alterações histopatológicas hepáticas e renais, tais como vacuolizações citoplasmáticas, hipertrofias e atrofia nucleares, presença de centros de melanomacrófagos, além nas modificações histológicas nas vilosidades e células intestinais. As concentrações do biopesticida, tanto na dieta como no ambiente aquático, aparentemente desencadearam ajustes fisiológicos e morfológicos moderados; porém, acredita-se que em concentrações elevadas podem ser mais nocivas à saúde dos peixes. Portanto, devido ao estreito contato dos peixes com o ambiente aquático e os efeitos de poluentes biopesticidas, o produtor deve estar atento à dispersão desses produtos agrícolas para a piscicultura.

**Palavras-Chave:** Peixes, Hematologia, Bioquímica, Histopatologia.



## ABSTRACT

Biopesticides have been used in agriculture to combat pests in place of chemical pesticides, with a promise not to cause environmental problems and to non-target organisms. However, in vertebrates, information about the effects of *Bacillus thuringiensis* based on biopesticide are scarce. The aim of this study was to investigate the effects of *B. thuringiensis* based on biopesticide, when added to tanks water and the diet, on histology (kidney, liver and intestine) and physiology of *P. mesopotamicus* and *A. gigas*, during 24 and 48 h. For the assays, the variety *B. thuringiensis* var. Kurkaki that contains spores of this bacterium was used. For assays, 0.13 g of this biopesticide was added in each kg of commercial feed and used in diet of the fish. For the groups that were submitted to the biopesticide directly in the water of the tanks were added 20 mg of the biopesticide for each liter of water (20 mg/L). *Arapaima gigas* and *P. mesopotamicus* exposed to *B. thuringiensis* presented physiological adjustments characterized by alterations (increases or reductions) in the erythrogram (hematocrit, hemoglobin, erythrocytes), thrombogram, leukogram, plasma biochemical profile (sodium, chloride, potassium, cholesterol, triglycerides, total protein, cortisol) and enzyme (Aspartate Amino Transferase and Alanine Amino Transferase). Histopathological alterations in the liver and kidney, such as cytoplasmic vacuolations, nuclear hypertrophy and atrophies, presence of melanomacrophages centers, and histological changes in the villi and intestinal cells were found. The concentrations of the biopesticide apparently caused moderate physiological and morphological adjustments; however, higher concentrations may be more harmful to fish health. Therefore, due to the close contact of fish with the aquatic environment and the effects of biopesticides, fish farmers should be aware of the dispersion of these agricultural products to fish farming.

**Keywords:** Fish, Hematology, Biochemistry, Histopathology.

## INTRODUÇÃO GERAL

Aquicultura é a produção de organismos cujos ciclos de vida naturais ocorrem, total ou parcialmente, em meio aquático. As várias atividades da aquicultura podem ser subdivididas nas seguintes especialidades: piscicultura (cultivo de peixes), malacocultura (cultivo de moluscos, como lulas, ostras e mexilhões), carcinicultura (cultivo de camarões, caranguejos e siris), algicultura (cultivo de micro ou macroalgas), ranicultura (cultivo de rãs) e cultivo de jacarés (BOTELHO et al., 2012).

Atualmente, a aquicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo. Ao contrário do que ocorre com a pesca extrativista, a produção da aquicultura segue crescendo sensivelmente (MOSER, 2005; MPA, 2013). Segundo estatísticas da FAO (2016), a contribuição da aquicultura na produção mundial de peixes, crustáceos e moluscos passou de 26% em 1994, para 39% em 2004. Além disso, Brasil foi o segundo maior produtor de pescado do continente americano, contribuindo com 22,2% da produção em 2012.

Existem várias arestas a serem ajustadas quando falamos de cultivo de peixes, como minimizar os diversos tipos de estressores (transporte, manipulação, doenças parasitárias, dentre outras), melhor forma de cultivo para determinada região (tanque escavado, tanque rede) e um dos principais problemas é a qualidade da água. A agricultura apresenta uma interface com a aquicultura quando se estuda os resíduos, químicos e biológicos, que são disponibilizados de forma indireta nos corpos d'água.

Na agricultura mundial, uma nova modalidade para combate de pragas são os biopesticidas, os quais prometem causar menos danos ambientais, uma vez que os mesmos são fabricados a base de inimigos naturais como é o caso das bactérias *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915. A utilização de biopesticidas é inerente e fundamental para o sucesso da disponibilidade de alimentos para o homem e animais. Conseqüentemente, o cultivo de organismos aquáticos muitas vezes recebe resíduos de biopesticidas e pesticidas oriundos de plantações, que pode afetar organismos aquáticos, incluindo peixes.

Esses resíduos quando vão para os ecossistemas aquáticos, naturais ou artificiais, podem contaminar os corpos d'água e viveiros de cultivo por lixiviação. Tais produtos podem ser também introduzidos nos ecossistemas aquáticos por aplicação direta, derrames acidentais, drenagem ou precipitação dos resíduos das plantações. Além disso, pode haver o uso direto na aquicultura, pois muito pesticidas que são usados como

controles de pragas da agricultura são também usados no controle de parasitos de peixes (MORAES et al., 2015; MARIANO et al., 2015).

Outra situação frequente é que muitas vezes as áreas adjacentes a esses cultivos são ocupadas por plantações que usam esses produtos, os quais podem comprometer a qualidade da água (GALINDO REYES et al., 2000; COMOGLIO et al., 2005; MOSER, 2005). Portanto, tais substâncias usadas na aquicultura ou agricultura poderão agir diretamente ou indiretamente sobre os organismos aquáticos, incluindo peixes, causando alterações morfológicas e fisiológicas, e até mesmo a morte desses animais (DEVI e MISHRA, 2013; MORAES et al., 2015). Porém, não há na literatura estudos sobre os efeitos de biopesticidas a base de *B. thuringiensis* na fisiologia e estrutura morfológica de peixes brasileiros.

Em organismos alvos, ou seja, larvas de insetos, após ingerir o biopesticida, a toxina atua diretamente nas células epiteliais do intestino, causando problemas na absorção nutricional e/ou abrindo poros neste tecido dando passagem para bactérias oportunistas. As larvas morrem por inanição ou por septicemia. Como esses esporos e cristais podem ser carreados para o ambiente aquático (rios, lagos, córregos, viveiros, outros) os peixes poderiam absorvê-los. Consequentemente, o que poderia ocorrer na fisiologia dos peixes expostos a biopesticidas a base de *B. thuringiensis*?

Com base nesse questionamento surge o presente estudo sobre “Os efeitos biológicos (fisiológico e morfológico) de um biopesticida a base de *B. thuringiensis* em duas espécies de peixes” de importância ecológica e econômica para região amazônica e para o Brasil, *Piaractus mesopotamicus* (pacu) e *Arapaima gigas* (pirarucu).

A ideia desta pesquisa surgiu durante a disciplina “Controle Biológico”, quando o pesquisador (doutorando) apresentou o seminário do artigo: “Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*” (MARTINS, et al., 2010) Inicialmente, foi feita uma busca por artigos associando *B. thuringiensis* e vertebrados de maneira geral e depois com vertebrados aquáticos, e os resultados mostraram poucos estudos publicados.

Por se tratar de um tema inédito e relevante para espécies de peixes amazônicos, surge o delineamento experimental. Novas questões emergem: Como os peixes podem se contaminar? Apenas pela diluição do biopesticida na água? Mas, e se os organismos aquáticos tiverem acesso via alimentação? Se ingerirem esses insetos e/ou vegetais

contaminados, o que pode acontecer? De posse dessas dúvidas surge a ideia de experimentar dois formatos de “intoxicação”, pela água e ração.

A concentração do produto foi embasada no artigo de Chapadense e colaboradores (2009), que testaram várias concentrações de um pesticida químico atrazina e a concentração inicial foi 20 mg/L. Realizou-se um projeto piloto com *P. mesopotamicus*, que é muito utilizado em pisciculturas em todas as regiões do Brasil, neste momento ainda se pensava apenas em análises hematológicas e bioquímicas para traçar os possíveis ajustes fisiológicos da espécie.

Como o Programa de Pós-Graduação, que essa tese está vinculada, estabelece conhecimentos e saberes amazônicos, surge à ideia de repetir o experimento com um peixe da Amazônia, o peixe gigante da Amazônia, o *A. gigas*. E como todo andamento em pesquisa, surgem novas possibilidades e incrementos, a histologia foi incorporada nas análises.

Essa tese está dividida em Introdução Geral, Revisão de Literatura sobre o tema, que foi publicada no livro: Mariano, W.S.; Moron, S.E.; Garcia, R.G.; Tavares-Dias, M. Impactos de pesticidas e biopesticidas na aquicultura, p.625-644. In: Tavares-Dias, M. & Mariani, W.S. Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. Vol. 1 e 2. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. 429p. E mais dois artigos: Artigo 1: “**Parâmetros fisiológicos e morfológicos de *Arapaima gigas* (Arapaimidae) exposto a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis***” e Artigo 2: “**Aspectos fisiológicos de *Piaractus mesopotamicus* (Serassalmidae) exposto a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis***”.

## REVISÃO DE LITERATURA

### PESTICIDAS, BIOPESTICIDAS E ESPÉCIES DE PEIXES ESTUDADAS.

#### Pesticidas ou Agrotóxicos

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas ou praguicidas, são termos usados para os vários produtos químicos usados na agricultura. São portanto, substâncias ou misturas de substâncias destinadas a impedir a ação ou matar diretamente insetos (inseticidas), ácaros (acaricidas) moluscos (moluscicidas), roedores (roenticidas), fungos (fungicidas), ervas daninhas (herbicidas), bactérias (bactericidas), nematoides (nematicidas), que podem ser nocivos à saúde humana e à agricultura (MOURA, 2008; JARDIM e ANDRADE, 2009; MARIANO et al., 2015).

Na tentativa de controlar e combater os efeitos danosos e indesejáveis de insetos vetores, no que se relaciona à saúde do homem, bem como as limitações impostas à produção agrícola com sérias repercussões econômicas, várias indústrias logo após a II Guerra Mundial começaram a pesquisar e produzir substâncias químicas com capacidade inseticida (SALDANHA et al., 2013).

A descoberta das propriedades inseticidas do organoclorado diclorodifeniltricloroetano (DDT), em 1939, é considerada um marco de transição nas técnicas de controle fitossanitário das culturas agrícolas. A introdução de agrotóxicos organossintéticos no Brasil teve início em 1943, quando chegaram às primeiras amostras do inseticida DDT (SANTIAGO, 1986).

Dentre os pesticidas utilizados, os mais consumidos são os herbicidas, seguidos dos inseticidas, fungicidas e acaricidas. Porém, pesticidas de controle biológicos tais como a base da bactéria *B. thuringiensis* e outros também vêm sendo usados, como alternativos (JARDIM e ANDRADE, 2009; MARIANO et al., 2015).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, enquanto o mercado brasileiro cresceu 190%. Kugler (2012) comenta que o Brasil é o maior consumidor global de insumos químicos para agricultura. Das 50 substâncias mais usadas no país, 24 delas já foram banidas nos Estados Unidos, Canadá, Europa e alguns países

Ásia. Desde 2008, 14 dessas substâncias estão em processo de reavaliação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (KUGLER, 2012).

Os pesticidas são classificados pela ANVISA em quatro classes de perigo para sua saúde:

- Classe I = extremamente tóxico
- Classe II = altamente tóxico
- Classe III = medianamente tóxico
- Classe IV = pouco tóxico

Os produtos da Classe II e I só devem ser utilizados se realmente necessários, nos casos em que não houver produtos das Classes IV ou III para a mesma “praga” ou doença, e que não exista nenhuma outra maneira de combate.

Os pesticidas ou agrotóxicos podem ser classificados em inorgânicos e orgânicos. Os inorgânicos foram muito utilizados no passado, mas atualmente não representam mais do que 10% do total usado. São produtos à base de arsênico e flúor e os compostos minerais que agem por contato matando a praga por asfixia. Os pesticidas orgânicos compreendem os de origem vegetal e organossintéticos. Os primeiros são de baixa toxicidade e curta permanência no ambiente (exemplo: rotenona extraída do *Derris urucu*). Os organossintéticos, além de persistirem muitos anos nos ecossistemas, contaminando-os, também trazem uma série de problemas de saúde para os seres humanos, o que torna seu uso proibido pelas correntes agroecológicas (AGROFIT, 2000; OLIVEIRA-SILVA et al., 2001; MALAJOVICH, 2012; MORAES et al., 2015).

Os pesticidas quando aplicados diretamente no solo podem ser degradados por vias químicas, fotólise ou ação de microrganismos. Entretanto, muitas moléculas de alta persistência podem permanecer no ambiente, sem sofrer qualquer alteração. Essas moléculas podem ser adsorvidas nas partículas do solo, sofrendo lixiviação e atingindo as águas superficiais e subterrâneas (KLAASSEN, 1995; MARIANO et al., 2015).

Após a aplicação de um agrotóxico, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino de agrotóxicos no ambiente é governado por processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica), de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial) e por interações desses processos (SPADOTTO et al., 2003).

Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental de agrotóxicos, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar esses processos. Condições meteorológicas, composição das populações de microrganismos do solo, propriedades físicas e composição química do solo, presença ou ausência de plantas, localização da área na topografia e práticas de manejo do solo podem também afetar o destino de agrotóxicos no ambiente. Além disso, a taxa e a quantidade de água que se move na superfície e no perfil do solo têm um grande impacto no movimento dos agrotóxicos (ANDREI, 1996; MARIANO et al., 2015).

Os agrotóxicos são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar, mas determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, o efeito pode então atingir não apenas o organismo que se espera controlar, como também outros seres do ambiente. A introdução de agrotóxicos no ambiente agrícola pode provocar perturbações ou impactos, porque pode exercer uma pressão de seleção nos organismos e alterar a dinâmica bioquímica natural, tendo como consequência, mudanças na função do ecossistema (CHARBONNEAU, 1979; MARIANO et al., 2015).

### ***Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) na agricultura**

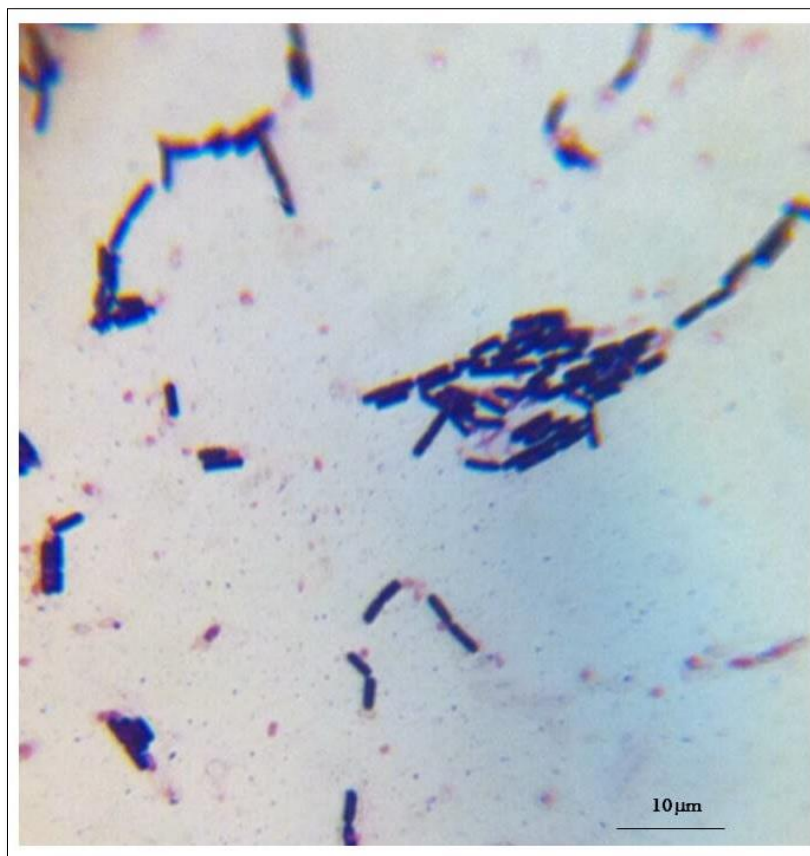
Na agricultura, o controle biológico tem obtido grandes avanços, visando a preservação das plantações e salvaguarda da produção de alimentos mediante a substituição dos pesticidas químicos por outros de fonte biológica, tais como bactérias, fungos e vírus entomopatogênicos (MALAJOVICH, 2012). A busca por pesticidas que diminuam o uso de inseticidas químicos tem sido feita em todo o mundo, com a finalidade de reduzir a poluição e os impactos causados ao meio ambiente. Além disso, os pesticidas podem interferir no equilíbrio ecológico, possibilitando então o surgimento de insetos resistentes (LIMA, 2010), ou seja, selecionando os insetos que possuem tolerância genética a determinados agentes químicos.

Os bioinseticidas, também chamados de entomopatógenos, em geral, são microrganismos que causam doenças nos insetos vetores. Na maioria dos casos, o efeito ocorre devido à presença de toxinas específicas, as quais têm sua ação no interior do inseto-alvo. Nos Estados Unidos, o primeiro agente microbiológico para controle de pragas (*Bacillus popilliae*) foi registrado em 1948 pelo Departamento de Agricultura

daquele país. Porém, até 2007, os Estados Unidos registraram cerca de 84 ingredientes biológicos-ativos compondo em torno de 262 produtos à base de microrganismos (OLIVEIRA-FILHO, 2008).

Um dos bioinseticidas mais conhecidos em todo o mundo é o *B. thuringiensis*, que foi descrito em 1915 na Alemanha, isolado a partir de traça de farinha (*Anagasta kuehniella*). O primeiro produto comercial a base dessa bactéria, chamado Sporeine® estava disponível somente em 1938 na França. Somente em 1957 foi produzida a primeira formulação comercial de *B. thuringiensis* (ANGELO et al., 2010; VILAS-BOAS et al., 2012).

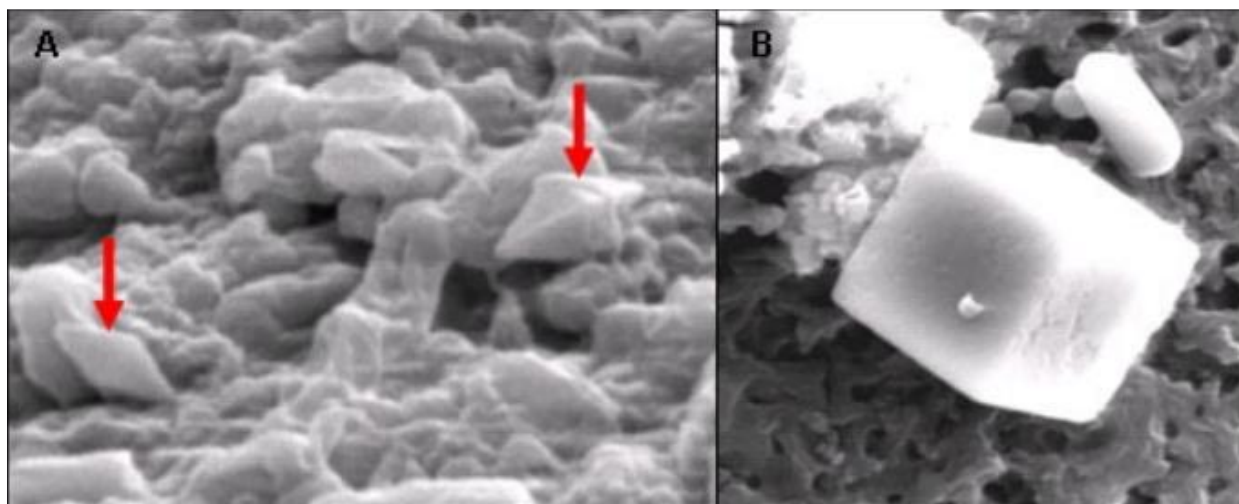
Atualmente, o exemplo mais conhecido da tecnologia verde é o *B. thuringiensis* (Fig. 1), uma bactéria que ocorre naturalmente no solo, água, insetos mortos e ambientes onde armazenam-se grãos (COUTINHO et al., 2010; CHEN, et al.; 2013; CHEN, et al.; 2014).



**Figura 1.** *Bacillus thuringiensis* cultivado a 35°C em estufa microbiológica por 24 horas a partir do biopesticida DiPel® em ágar Mueller Hinton, corado através da técnica de Gram, observado em microscopia de luz.



*Bacillus thuringiensis* (*Bt*), é uma bactéria gram-positiva e aeróbia, que produz toxinas em forma de inclusões proteicas cristalinas e esporos. Tais inclusões são compostas por proteínas tais como  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas-Cry (Fig. 2), muito tóxicas a uma grande variedade de insetos-praga de importância econômica e também a outros invertebrados (LIMA, 2010; MACEDO et al., 2012; MARTINS et al., 2014; MARIANO et al., 2015).



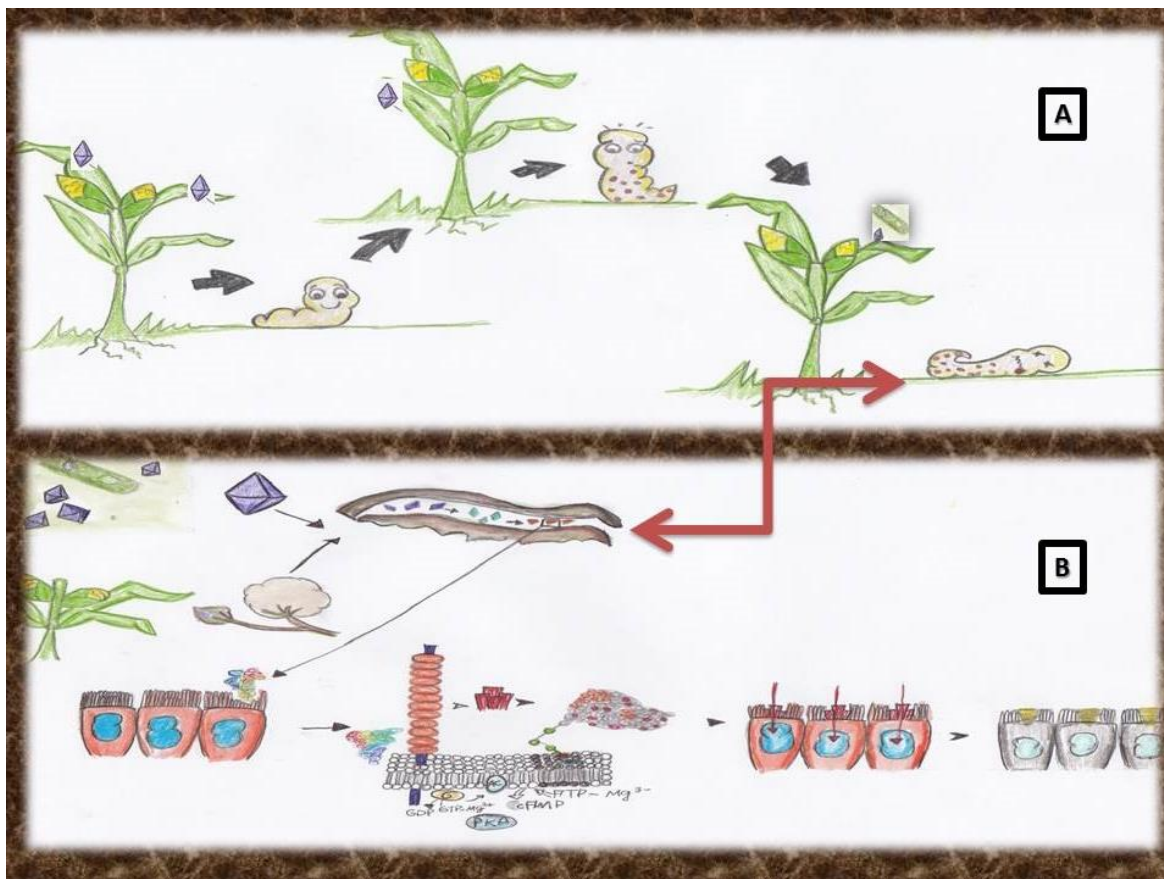
**Figura 2.** Morfologia dos cristais de *Bacillus thuringiensis*. (A) Bipiramidal; (B) Cubóide. Fonte: Gusmão, F.P. (2013).

Há mais de trinta anos o *B. thuringiensis* vem sendo utilizado como pesticida agrícola, sem que suas toxinas tenham causado danos ao homem, à vida silvestre ou à maioria dos insetos benéficos (POLANCZY e ALVES, 2003). Com o advento da engenharia genética foi possível transferir os genes correspondentes a várias plantas (milho, algodão, outros) que contemporaneamente produzem diretamente a toxina-inseticida (MALAJOVICH, 2012).

Várias linhagens de *B. thuringiensis*, específicas para algumas ordens de inseto, tais como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, têm sido isoladas (MACEDO et al., 2012). Atualmente, há numerosos produtos à base dessa bactéria comercializados com diferentes nomes comerciais (Bac-control, Bactur, Dipel, Ecotech, Thuricide, outros), por empresas nacionais e internacionais (Vectorcontrol, Milenia, Sumitomo, Bayer, Iharabras, outros) (MALAJOVICH, 2012).

O mecanismo de ação do *B. thuringiensis* compreende várias etapas, como a solubilização do cristal, processamento das toxinas, interações específicas com receptores, união ao receptor e inserção de uma parte da toxina na membrana apical das células intestinais dos insetos.

Os receptores responsáveis pela ligação da toxina à membrana têm sido estudados em lepidópteros, para determinar especificidade, toxicidade e mecanismo de ação das toxinas-Cry (MACEDO et al., 2012). A maioria das linhagens de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal, pode ser formado por diferentes proteínas-Cry e, as vezes pode ocorrer até cinco toxinas sintetizadas por uma mesma linhagem (LIMA, 2010; MACEDO et al., 2012). Nos insetos (Fig 3- A), os efeitos tóxicos dos esporos e cristais de *B. thuringiensis* manifesta-se com imediata paralisação do tubo digestório e peças bucais, levando a lise celular e provocando a interrupção alimentar. A destruição das células colunares e caliciformes proporcionam a entrada de esporos, onde germinam, provocando então um colapso do intestino médio (Fig 3- B), a inanição e posterior a septicemia, levando o inseto à morte (DAÍ e GILL, 1993; MONNERAT e BRAVO, 2000; LIMA, 2010).



**Figura 3.** Desenho esquemático representando a ação do biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. A – Inseto se alimentando de folhas contendo o biopesticida; B- Ação dos Biopesticidas nas células do epitélio intestinal de larvas de insetos. Fonte: Camila Pereira dos Santos (2015).

## **Impactos dos pesticidas e biopesticidas na aquicultura**

As substâncias químicas, tais como os pesticidas, que por algum motivo interagem de forma direta ou indireta com organismos aquáticos, são conhecidas como xenobióticos. As células, tecidos e órgãos são as porções com maior acometimento dos efeitos dos xenobióticos, por estarem em contato direto com o meio aquático, como brânquias e pele, além do fígado e rim (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994; PIEDADE et al., 2014).

Alguns xenobióticos causam efeitos diretos no tecido branquial, mas a maioria das lesões aparece como resultado de respostas de defesa ou mecanismos compensatórios, representando estratégias adaptativas para a conservação de funções biológicas quando o peixe enfrenta mudanças ambientais naturais ou antrópicas (DEVIA e MISHRA, 2013; PIEDADE et al., 2014).

Quando essas substâncias químicas, xenobióticos, conseguem invadir os órgãos internos ocorre um desequilíbrio homeostático, seguido por diversas alterações fisiológicas, otimizando a piora do quadro do animal contaminado (WENDELAAR BONGA, 1997; MORAES et al., 2015), e histopatológicas (SCHWAIGER et al., 1997; POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994; DEVI e MISHRA, 2013). O desencadeamento de alterações provocadas por estressores químicos acontecem inicialmente a nível molecular, como consequência da interação do xenobiótico com as moléculas que compõem o organismo. Dessa forma, a interação do xenobiótico com receptores, enzimas, dentre outras moléculas, podem causar alterações no metabolismo, culminando em morte celular por necrose ou apoptose. As alterações no material genético também são comuns, caracterizando assim, o xenobiótico como agente genotóxico (UDROIU, 2006).

Chen e colaboradores (2014) descreveram a primeira ocorrência de mortalidade em tartarugas *Trionyx sinensis* cultivadas na China devido à doença causada por *B. thuringiensis*. Portanto, os biopesticidas *B. thuringiensis* poderiam afetar outros vertebrados, como por exemplo, *A. gigas* e *P. mesopotamicus*, ambas espécies de peixes objeto desse estudo.

Concentrações subletais de pesticidas como DDT, Lindane e Diazinon causam alterações fisiológicas e bioquímicas em camarões expostos a esses produtos (GALINDO-REYES et al., 2000), afetando a produtividade dos cultivos. Os inseticidas,

quando absorvidos pelos organismos aquáticos, causam reações neurotóxicas, capazes de provocar efeitos adversos no sistema nervoso central, em nervos periféricos e órgãos do sentido. Esses efeitos são considerados reversíveis quando ocorrem mudanças funcionais temporárias e, irreversíveis, quando envolvem mudanças estruturais com degeneração das células nervosas. Pesticidas quando absorvidos por esses organismos são metabolizados e excretados rapidamente, sem permitir a ocorrência da acumulação nos tecidos vegetais e animais (LU, 1996; LARINI, 1997; MOSER, 2005). Foram relatadas lesões em diferentes órgãos de peixes exposto ao pesticida triclorfon (RODRIGUES et al., 1998, RODRIGUES et al., 2001; MATAQUEIRO et al., 2009; THOMAZ et al. 2009).

Contaminantes orgânicos podem causar, além de outras alterações, a indução de enzimas que atuam na metabolização ou detoxificação dos mesmos, ou, em alguns casos, produzir metabólitos ativos. Durante o processo de biotransformação, outras alterações envolvem a indução de enzimas decorrente de interações destes contaminantes com receptores celulares e, ainda alterações no DNA. Estas respostas podem não causar nenhum dano evidente ao organismo, porém podem trazer consequências para as células ou para todo o organismo, afetando, por exemplo, seu crescimento e reprodução. Conseqüentemente, as alterações bioquímicas são a primeira resposta de ação biológica e representam a base molecular da toxicidade (WALKER et al., 1996; MOSER, 2005).

Neste contexto, biomarcadores fisiológicos e histopatológicos têm a capacidade de integrar os efeitos de estresses múltiplos e podem ajudar a elucidar os efeitos e modo de ação dos de xenobióticos (HUGGETT et al., 1992; POLEKSIĆ e MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, 1994; SCHWAIGER et al., 1997; RODRIGUES et al., 1997; MATAQUEIRO, 2002; DEVI e MISHRA, 2013; PIEDADE et al., 2014). Assim, o complexo fisiológico de defesa dos organismos aquáticos (sistema imune) deve ser amplamente estudado, compreendido e socializado, pois são ferramentas inatas que auxiliam nos processos de ajustes quando estão sob efeito de águas com poluentes e pesticidas, vale lembrar que cada espécie tem suas estratégias imunológicas para driblar as situações adversas.

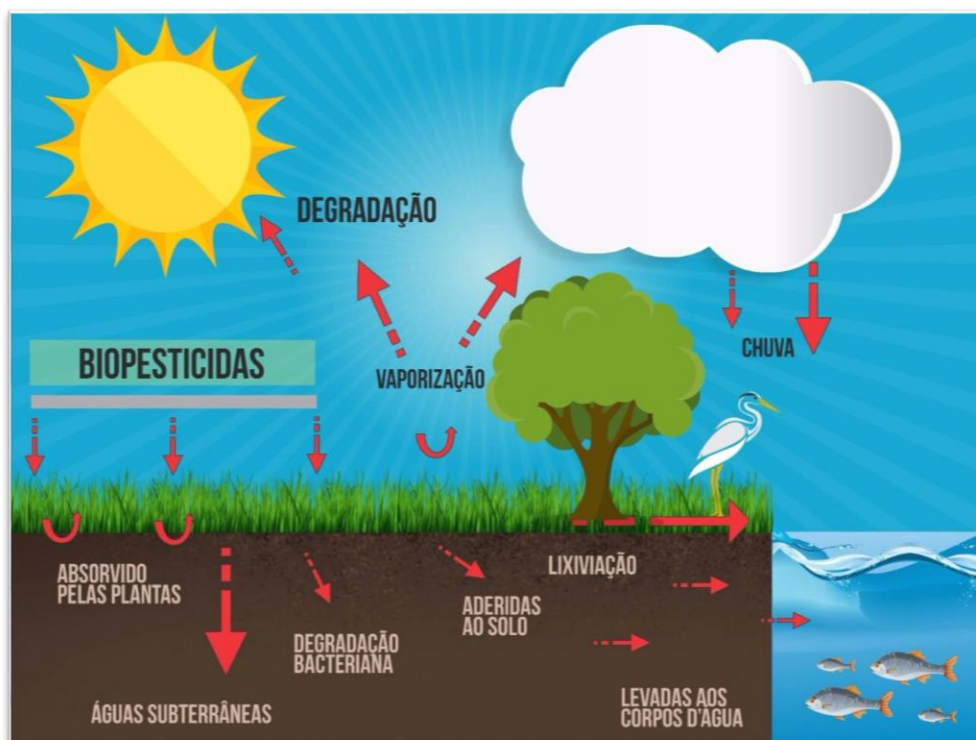
## **O uso de pesticidas na piscicultura**

Os ecossistemas (terrestres e aquáticos) são constituídos de agentes bióticos e abióticos que podem ser alterados com a inserção de substâncias químicas (Fig. 4), causando modificações na composição do solo, eliminando espécies (vegetais e animais)

nativas e propiciando a proliferação de espécies invasoras, mudando muitas vezes as vocações ecológicas do local.

A piscicultura é uma atividade importante na produção de proteína animal para o consumo do homem. No entanto, o desenvolvimento enfrenta problemas relacionados à alimentação dos peixes, qualidade da água, doenças infecciosas e parasitárias. Assim, esses problemas são considerados os principais fatores limitantes para piscicultura, do ponto de vista econômico e sanitário (CECCARELLI et al., 1990; PAVANELLI et al., 2002; MARTINS et al., 2002; MORAES et al., 2015).

O controle de parasitoses de peixes geralmente é feito usando pesticidas aplicados sem orientação adequada e indiscriminadamente (RANZANI-PAIVA et al., 1997; RODRIGUES et al., 1997; SELVIK et al., 2002; MAXIMIANO et al., 2005; LUVIZOTTO-SANTOS et al., 2009; MORAES et al., 2015).



**Figura 4.** Esquema que ilustra a dinâmica dos biopesticidas no meio ambiente, adaptado de Benzi, T.P. (2013).

Luvizotto-Santos et al. (2009) verificaram que nas pisciculturas e pesqueiros da bacia do Rio Mogi Guaçu (SP), 77,4 % das propriedades executam práticas de manejo que requerem o uso de substâncias químicas. Diversos empreendimentos (39,3%) já

utilizou praguicidas, sendo que do total de formulações empregadas, 94,1% foram inseticidas e o restante herbicidas. Resultados similares foram relatados por Esteves e Ishikawa (2007), em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo.

Os parasitos podem causar prejuízos devido à redução no crescimento e mortalidade nos peixes, mas os insetos aquáticos são considerados os que mais causam perdas na fase de alevinagem (GARÁDI et al., 1988). Produtores de salmão enfrentam o desafio de eliminar o crustáceo *Lepeoptheirus salmonis* usando praguicidas azametifos, cipermetrina, deltametrina, diflubenzuron e teflubenzuron (SELVIK et al., 2002). A principal forma de combater crustáceos ectoparasitos em peixes cultivados tem sido através do uso de pesticidas, em especial os organofosforados, benzoilfeniluréias, carbamatos e piretróides (HORSBERG et al., 1989; LESTER e ROUBAL, 1995; SHEPHERD, 1995; RODRIGUES et al., 1997; MORAES et al., 2015).

Organofosforado foi usado no controle de odonatas, principal inseto predador de peixes (GARÁDI, 1988; SENHORINI et al. 1991; CARR e CHAMBERS, 1996; MATAQUEIRO, 2002), além de outras finalidades. Pesticidas organofosforados são comumente utilizados na preparação de viveiros de recepção de larvas de peixe (JUAREZ e ROUSE, 1983; OPUSZYNSKY et al., 1984).

De acordo com estudos conduzidos por Luvizotto-Santos et al. (2009), diflubenzuron (Dimilin<sup>®</sup>) foi o pesticida mais utilizado em pisciculturas na região da bacia do Rio Mogi-Guaçu, seguido pelo paration-metílico e triclorfon. Mabilia e Souza (2006) relaram que em pisciculturas do estado do Rio Grande do Sul, o diflubenzuron é o ingrediente ativo mais usado quando comparado as vermectinas e organofosforados. Diflubenzuron também tem sido usado para eliminar crustáceos lerneídeos e isópodos que infestam *Colossoma macropomum* (tambaqui), cultivados no estado do Amapá (TAVARES-DIAS et al., 2011; TAVARES-DIAS et al., 2014). Porém, o pesticida Teflubenzuron tem sido indicado para tratamento contra de ciliados *Trichodina* spp. (IKEFUTI et al., 2015).

Triclorfon tem sido recomendado para eliminar de trematodes, copépodes (JUAREZ e ROUSE, 1983), ergasilídeos e monogeneas de peixes (PAVANELLI et al., 1999). Porém, alguns pesticidas apresentam maior persistência no meio ambiente e tendência de acumulação na cadeia trófica, enquanto outros apresentam menor persistência no ambiente (BEGUM e VIJAYARAGHAVAN, 1995; VARÓ et al., 2000; PEHKONEN e ZHANG, 2002; SOGORB e VILANOVA, 2002; NEMR e ABD-

ALLAH, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2011; TAVARES-DIAS et al., 2014). Assim, biopesticidas têm sido usados em substituição a alguns pesticidas nas atividades agrícolas.

### **Efeitos fisiológicos e histopatológicos de pesticidas em peixes**

O uso indiscriminado de pesticidas tem resultado em poluição ambiental, contaminação dos peixes de cultivo e outros organismos aquáticos envolvidos na cadeia alimentar (RANZANI- PAIVA et al., 1997; RODRIGUES et al., 1998). Além disso, a maioria dos pesticidas utilizados na piscicultura pode resultar em altos níveis de resíduos na carne dos peixes, inclusive no momento do consumo, pois em geral o período de carência não é respeitado pelos produtores. Os pesticidas podem causar consideráveis alterações, quando possuem a capacidade de bioacumularem em tecidos dos animais (SERRANO et al., 1995; TSUDA et al., 1996; KITAMURA et al., 2000; AMARANENI e PILLALA, 2001; LOPES et al., 2006).

Após exposição ao triclorfon verificou-se lesões hepáticas em *Brachydanio rerio* (RODRIGUES et al., 1998) e *Prochilodus lineatus* (RODRIGUES et al., 2001), bem como nas brânquias, fígado e rim de *P. mesopotamicus* (MATAQUEIRO et al., 2009). Além disso, foram relatadas alterações em parâmetros hematológicos e atividade da acetilcolinesterase em *Cyprinus carpio* (CHANDRASEKARA e PATHIRATNE, 2005). Mataqueiro et al. (2014) observaram inibição da atividade da colinesterase no plasma e cérebro de *P. mesopotamicus* expostos ao triclorfon. Thomaz et al. (2009) verificaram hipertrofia cardíaca, possivelmente devido ao efeito hipertensivo desse organofosforado e/ou pelo estresse oxidativo, induzido no tecido cardíaco de *Oreochromis niloticus*.

Após exposição de *Tilapia mossambica* a metil-paration houve bloqueio na condução do impulso nervoso e diminuição da atividade da acetilcolinesterase em tecidos tais como músculo, brânquias, fígado e cérebro (RAO e RAO, 1984). Esse mesmo pesticida também causou inibição da acetilcolinesterase no cérebro, brânquias, fígado e músculos de *Ictalurus punctatus* (STRAUS e CHAMBERS, 1995). Metil-paration teve efeito negativo no metabolismo energético de *Brycon amazonicus* (AGUIAR et al., 2004). Srivastava e Singh (1981) quando submetem *Heteropneustes fossilis* à concentração subletal de metil-paration (5,6 mg/L) verificaram uma diminuição dos níveis do glicogênio do músculo e fígado, bem como diminuição dos níveis de glicose sanguínea.

Moraes et al. (2015) citam que piretroides podem causar processos anemiantes em peixes, devido redução do hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos, resultante

de hemólise ou dano branquial. Porém, pode haver também um aumento desses parâmetros do eritrograma em peixes expostos a tais pesticidas. Além disso, piretroides podem provocar alterações osmorregulatórias e iônicas, tais como interferência na atividade de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e nas concentrações iônicas ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) em peixes, bem como a proliferação de células cloreto. Portanto, devido a contaminação de ambientes aquáticos por pesticidas e suas ações adversas em peixes, estudos sobre efeitos do *B. thuringiensis* devem ser conduzidos em diferentes espécies de peixes, principalmente, naquelas de interesses econômicos tais como pacu e pirarucu.

### **Peixes alvos deste estudo**

A potencialidade da piscicultura brasileira vem crescendo a partir do início da década de 90, com a profissionalização da atividade e surgimento de tecnologias para a produção de alevinos dos peixes redondos como pacu e tambaqui e seus híbridos. Porém, a tecnologia de produção de alevinos de pacu já era dominada desde o final da década de 80 (KUBITZA e KUBITZA, 1998; KUBITZA et al., 2007).

No Brasil, a produção de pescado vem crescendo anualmente. No período de 2007 a 2009, a aquicultura teve um crescimento de 43% (LOPERA-BARRERO et al., 2011). Em 2011, a produção foi de 1.431.974,4 toneladas, registrando-se um incremento de aproximadamente 13,2% em relação a 2010, sendo a aquicultura continental foi responsável por 38,0% (544.490,0 t) dessa produção total (MPA, 2013). Por isso, a taxa de crescimento anual da aquicultura vem superando as demais atividades zootécnicas praticadas no país. Inúmeras espécies de peixes nativos de interesse para a piscicultura continental vem sendo utilizados. Porém, entre os peixes nativos cultivados o *P. mesopotamis* é o peixe bastante cultivado na região Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (MPA, 2013). Porém, nos estados do Nordeste e Amazônia, há também o cultivo de *A. gigas*, o peixe gigante da Amazônia, uma das espécies nativas mais promissoras para a piscicultura brasileira (BARD e IMBIRIBA, 1986).

### ***Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**

*Piaractus mesopotamicus* (Fig. 5), conhecido popularmente como pacu, tem a seguinte classificação sistemática:



Classe: Actinopterygii

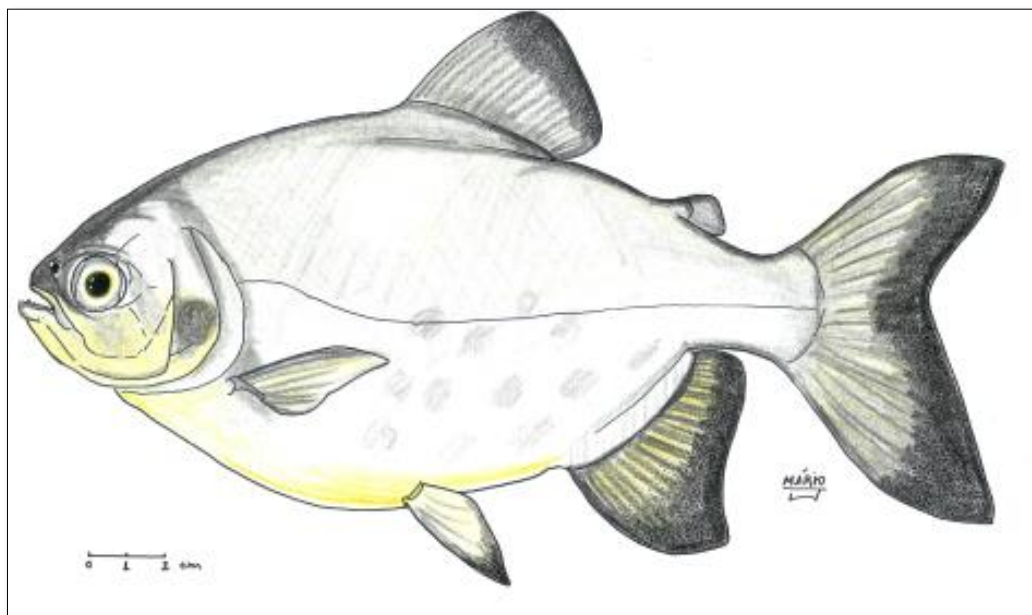
Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Serrasalminae

Gênero: *Piaractus*

Espécie: *P. mesopotamicus*



**Figura 5.** Espécime de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Ilustração: Mário Júnior Saviato (2016).

O pacu é uma das espécies de clima subtropical encontrada na bacia dos rios Paraguai-Paraná, América do Sul. Quando adulto, apresenta coloração cinza escuro prateada no dorso e lateralmente e branca, ventralmente, com peito amarelado. Habita florestas inundadas e se alimentam de frutos que caem das árvores. Pode atingir 80 cm e com peso de 30 kg no máximo, respectivamente (JOMORI et al., 2005). Dentre as espécies de peixes cultivados no Brasil, o pacu tem uma representação significativa comercialmente devido a facilidade de manuseio, com taxa de crescimento rápida e boa aceitação por parte dos consumidores (CASTRO, 2006; MORON et al., 2006; VENTURINI et al., 2015). Este peixe é também cultivado em outros países Sul-americanos tais como Argentina e Uruguai. A produção de peixes juvenis desta espécie no Brasil, alcançou 9 milhões de indivíduos anuais (CASTAGNOLLI, 1995; BORGHETTI et al., 2003). Assim, a produção nacional deste peixe proveniente da piscicultura foi de 21.689,3 toneladas em 2011 (MPA, 2013).

***Arapaima gigas* Schinz, 1822.**

*Arapaima gigas* (Fig. 6), conhecido popularmente como pirarucu, tem a seguinte classificação sistemática:

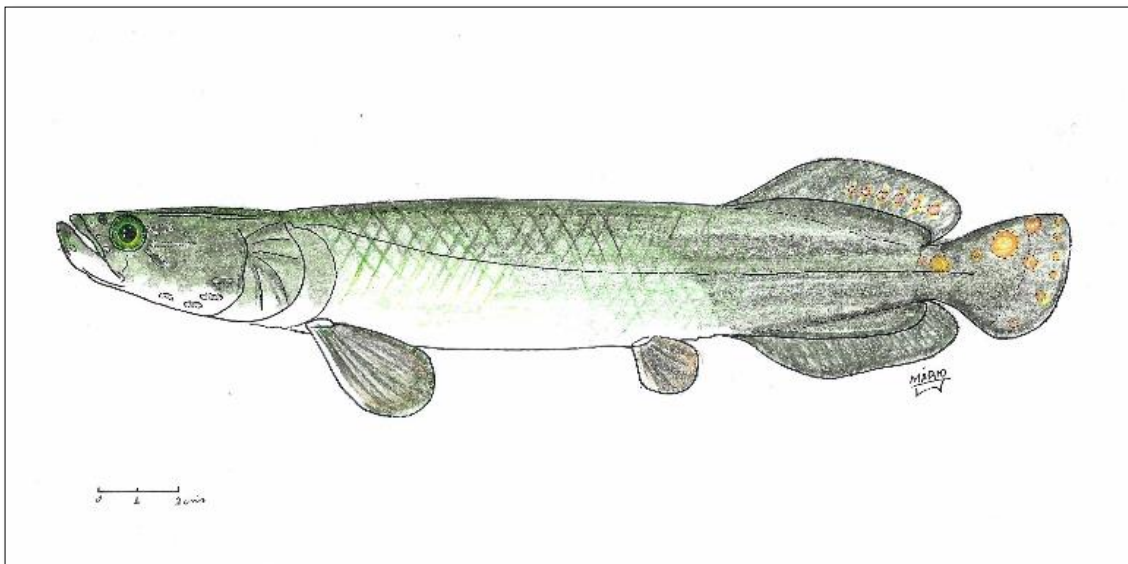
Classe: Actinopterygii

Ordem: Osteoglossiformes

Família: Arapaimidae

Gênero: *Arapaima*

Espécie: *A. gigas*



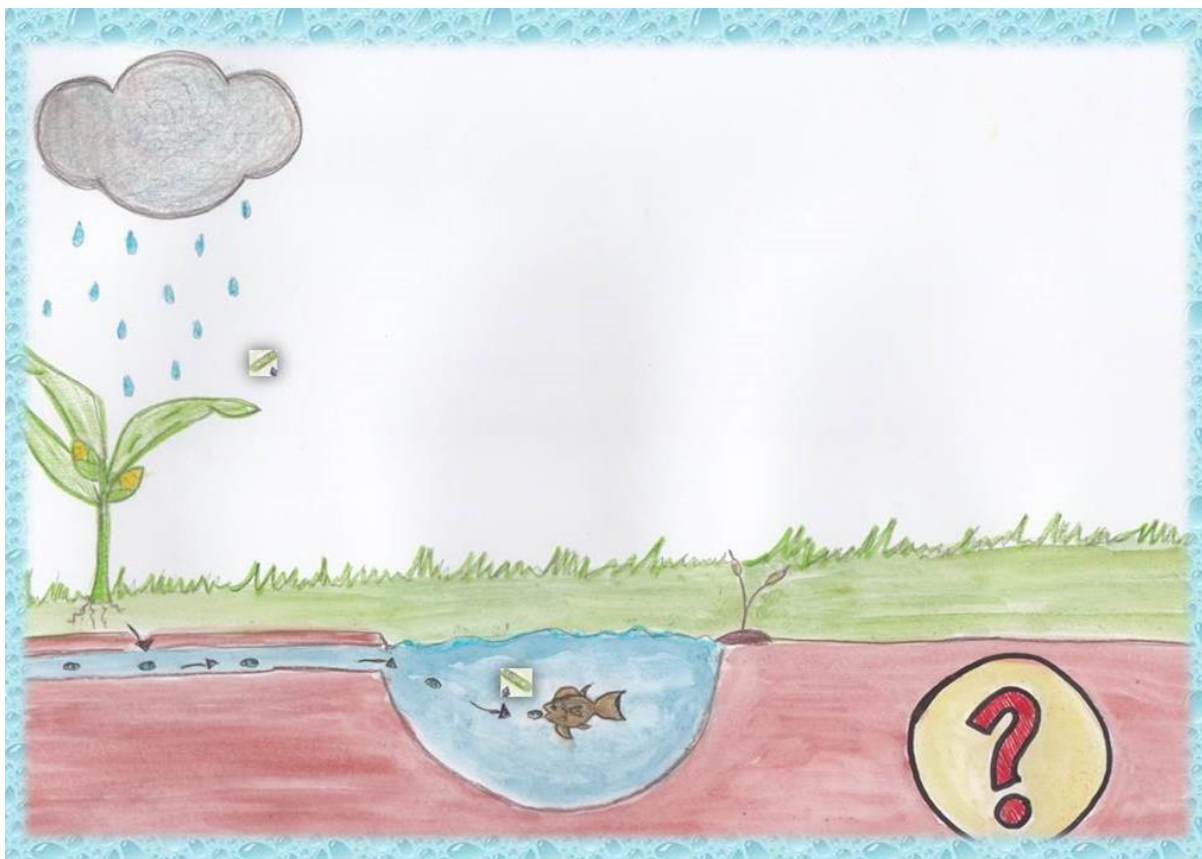
**Figura 6.** Pirarucu *Arapaima gigas*. Ilustração: Mário Júnior Saviato (2016).

O pirarucu é uma das espécies de maior porte dos peixes de água doce, com isso apresenta grande interesse para exploração pesqueira (MARQUES, 2003). Tem atraído também a atenção dos criadores de peixes da região Amazônica, pelo seu rápido crescimento e ganho de peso, fácil manejo e alta taxa de sobrevivência. Possui respiração aérea, facilitando a criação em ambientes hipóxicos, tem boa adaptação ao adensamento. Seu crescimento é muito rápido, atingindo 8-10 kg nos primeiros 12 meses e 16 kg aos 18 meses, quando alimentados com ração entre 40% e 44% PB bruta (ALCANTARA e GUERRA, 1992; PEREIRA-FILHO et al., 2003; ONO et al., 2004; CAMPOS, 2011). Entretanto a produção nacional deste peixe proveniente da piscicultura foi de apenas

1.137,1 t em 2011 (MPA, 2013), principalmente devido a entraves na produção de alevinos.

Ramos (2008) cita que o pirarucu apresenta dois modos de respiração, a aquática e aérea, em etapas distintas do seu desenvolvimento. Até o oitavo ou nono dia após a eclosão dos ovos essa espécie apresenta exclusivamente respiração branquial e, em animais jovens, a estrutura branquial é semelhante àquela dos peixes teleósteos de respiração exclusivamente aquática até certo tamanho, existe uma dependência das brânquias para a respiração. Em animais adultos, embora possa ocorrer absorção de oxigênio através do epitélio branquial, esta não é suficiente para suprir a demanda do oxigênio no animal, sendo que a maior absorção de oxigênio ocorre através da bexiga natatória modificada, que é muito semelhante ao pulmão dos peixes pulmonados, entretanto este órgão apresenta apenas uma câmara diferentemente dos pulmões que são, geralmente, órgãos pares. (GRAHAM, 1997; VAL e ALMEIDA-VAL, 1995).

O uso do biopesticida *B. thuringiensis* tem sido incentivado devido ao menor risco ao ambiente e a saúde do HOMEM (PETRY et al., 2004). Porém, há poucos estudos sobre os impactos desse biopesticidas em organismos aquáticos (Fig. 7). Apesar da propalada inocuidade desse biopesticida quando usado no combate de pragas e vetores, recentemente, foram relatados infecção bacteriana e efeitos adversos do *B. thuringiensis* em espécies aquáticas (JONSSON, et al., 2014; CHEN et al., 2014). Portanto, esses resultados demonstram a eminente necessidade de estudos, principalmente em espécies de peixes de cultivo.



**Figura 7.** Desenho esquema representando o carreamento dos biopesticidas a base de *Bacillus thuringiensis* para ambientes aquáticos, sinalizando para a falta de informações sobre o que acontece com organismos aquáticos se ingerirem essa bactéria. Fonte: Camila Pereira dos Santos (2015).

## REFERÊNCIAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Agrofit**, 1:1-2, 2000.

AGUIAR, L. H.; MORAES, G.; AVILEZ, I.M.; ALTRAN, A.E.; CORREA, C.F. Metabolical effects of folidol 600 on the Neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research**, 95:224-230, 2004.

ALCANTARA, F. B.; GUERRA, H. F. Cultivo del paiche, *Arapaima gigas*, utilizando bujurqui, *Cichlassoma bimaculatum*, como presa. **Folia Amazonica**, 4:129-139, 1992.

AMARANENI, S. R. PILLALA, R. R. Concentration of pesticide residues in tissue of fish from Kolleru Lake in India. **Environmental Toxicology**, 16:550-556, 2001.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prática de produtos fitossanitários para uso agrícola**. Andrei Editora, São Paulo (SP), 506p. 1996.

ANGELO, E. A. VILAS-BOAS, G.T.; CASTRO-GOMES, R.J. *Bacillus thuringiensis*: Características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, 31:945-958, 2010.

BARD, J.; IMBIRIBA, E. P. Piscicultura do pirarucu, *Arapaima gigas*. **Boletim Embrapa-CPATU**, 52. Belém (PA), 17p. 1986.

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* L. during Dimethoate exposure. **Food and Chemical Toxicology**, 5: 423-426, 1995

BORGHETTI, N.R.B; OSTRENSKY,S.; BORGHETTI, J.R **Aquicultura uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no Mundo**. Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais. Curitiba (PR), 128p. 2003.

BOTELHO, R. G., ALVES, P. A. DE T., MARANHO, L. A., MONTEIRO, S. H., SOUSA, B. A. I., AVELAR, D. S., TORNISIELO, V. L. Prós e contras da aplicação de pesticidas na aquicultura. **Visão Agrícola**, Piracicaba, 8(11):45-48, 2012.

CAMPOS, J.L. A produção de peixes nativos no Brasil. **Revista Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, 12:52-54, 2011.

CARR, R. L.; CHAMBERS, J. E. Kinetic analysis of the in vitro inhibition, aging, and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, 139:365-373, 1996.

CASTAGNOLLI, N. Status of Aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, 26:35-39, 1995.

CASTRO, F. J. Relação parasito-hospedeiro entre pacu, *Piaractus mesopotamicus* e o ectoparasita *Dolops carvalhoi* (Lemos de Castro, 1949). **Tese de Doutorado**. São Carlos, 180p. 2006.

CECCARELLI, P.S; FIGUEIRA, L.B; FERRAZ DE LIMA, C.B.L.; OLIVEIRA, C.A. Observações sobre a ocorrência de parasitas no CEPTA entre 1983 e 1990. **Boletim Técnico do CEPTA** , 3:43-54, 1990.

CHANDRASEKARA, H. U.; PATHIRATNE, A. Influence of low concentrations of Trichlorfon on haematological parameter and brain acetylcholinesterase activity in common-carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**, Inglaterra, 36:144-149, 2005.

CHAPADENSE, P.F.G.; CASTRO, F.J.; ALMEIDA, J.A.; MORON, S.E. Toxicidade de herbicida atrazine em *Collossoma macropomum*. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** 10(2):398-405, 2009.

CHARBONNEAU, J. P. **Enciclopédia de Ecologia**. EdUSP, São Paulo (SP), 479p. 1979.

CHEN J., ZHU N., KONG L., BEI Y., ZHENG T., DING X., HE Z. First case of soft shell disease in Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinens*) associated with *Aeromonas sobria*—*A. veronii* complex. **Aquaculture**. 406:62–67, 2013.

CHEN, J.; ZHU, N.; KONG, L.; ZHENG,T.; DING, X.; HE, Z. **First reported fatal *Bacillus thuringiensis* infections in Chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*)**. **Aquaculture**. 429:16-20, 2014.

COMOGLIO, L.; AMIN, O.; ROQUE, A.; HARO, B.M. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. **Ecotox. and Environ**, 62:66-74, 2005.

COUTINHO, A.; SOUSA, A.; COSTA, M.; CORDEIRO, P.; FERREIRA, T.; OLIVEIRA, T. **Produção de biopesticidas**. Universidade do Porto, 19p. 2010.

DAI S. M.; GILL, S. S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinque fuscatus* larval midgut proteases. **Insect Biochem Molec Biol**, 23:273-283, 1993.

DEVI, Y.; MISHRA, A. Histopathological Alterations in gill and liver anatomy of fresh water, air breathing fish *Channa punctatus* after pesticida Hilban® (Chlorpyrifos). **Ad. Biores**, 4:57-62, 2013.

ESTEVES, K. E.; ISHIKAWA, C. M. Características gerais e práticas de manejo em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo. In: ESTEVES, K.E.; ANT'ANNA, C.L. (orgs.) **Pesqueiros sob uma Visão Integrada de Meio Ambiente, Saúde Pública e Manejo**. Rima ed., 240p. 2007.

FAO. DNA-based Molecular Diagnostic Technics. **FAO – Fisheries Technical Paper**, Bangkok (TH), 99p. 2004.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224p. 2016.

GALINDO-REYES, J.G.; DALLA-VENEZIA, L.; LAZCANO-ALVARES, G.; RIVAS-MENDOZA, H. Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. **Chemosphere**, 40:233-237, 2000.

GARADI, P.; DOMARCO, R.C.; ARAÚJO, O.J.; PINHEIRO, C.W.L. Avaliação do uso de inseticidas (orgânicos fosforados) no combate às odonatas e na seleção zooplantônica em piscicultura de alevinagem. In: CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco. **Estudos de piscicultura**. 2ª ed., Brasília: 71p. 1988.

GRAHAM, J. **Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity and Adaptation**. Academic Press, 299p, 1997.

GUSMÃO, F. P. **Biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis***. Monografia. USP, Lorena (SP), 42p. 2013.

HORSBERG, T. E.; HY, T.; NAFSTAD, Y. Organophosphate poisoning of Atlantic salmon in connection with treatment against salmon lice. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 30:385-390, 1989.

HUGGETT, J.R.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE-JR, P.M.; BERGMAN, H.L. Biomarkers: biochemical, physiological e histological markers of anthropogenic stress. SETAC, Lewis Publishers, 347p. 1992.

IKEFUTI, C. V.; CARRASCHI, C.V; BARBUI, R., CRUZ,C.; PÁDUA, S. B.; ONAKA, E. M.. RANZANI-PAIVA, M.J.T. Teflubenzuron as a tool for control of trichodinids in freshwater fish: Acute toxicity and in vivo efficacy. **Experimental Parasitology**, 154:108-112, 2015.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, 32:996-1012, 2009.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MARTINS, M.I.E.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, 234:175-183, 2005.

JONSSON, M.; FICK, J; KLAMINDER, J.; BRODIN, T., Antihistamines and aquatic insects: Bioconcentration and impacts on behavior in damselfly larvae (Zygoptera). **Science of the Total Environment**, 472:108–111, 2014.

JUAREZ, L. M.; ROUSE, D. B. Acute toxicity of trichorfon to juvenile freshwater prawn. **Progressive Fish-Culturist**, 45:214-216, 1983.

KITAMURA, S.; KADOTA, T.; YOSHIDA, M. JINNO, N.; OHTA, S.; Whole-body metabolism of the organophosphorus pesticide, fention, in goldfish, *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, Oxford, 126:259-266, 2000.

KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons. Mc Graw Hill, 31p. 1995.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. Degaspari ed., Piracicaba (SP), 54p. 1998.

KUBITZA, F.; ONO, E. A.; CAMPOS, J. L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: Uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, 17(102):14-23, 2007.

KUGLER, H. Paraíso dos Agrotóxicos. **Ciência Hoje**, 50:21-25, 2012.

LARINI, L. Toxicologia. Manole ed. São Paulo (SP). 268p. 1997.

LESTER, R. J. G.; ROUBAL, F. R. Phylum Arthropoda. In: Woo, P.T.K. (org.) **Fish Diseases and Disorders**. CAB International, University Press. Cambridge (UK), 808p. 1995.

LIMA, G. M. S. Proteínas Bioinseticidas Produzidas por *Bacillus thuringiensis*. In: **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, 7:119-137, 2010.

LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; VARGAS, L.D.M.; POVEDA-PARRA, A.R.; DIGMAYER, M. As principais espécies produzidas no Brasil,. In: LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; VARGAS, L.D.M.; POVEDA-PARRA, A.R.; DIGMAYER, M. **Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo**. Agrolivros, Guaíba, 1:143-215, 2011.

LOPES, R. B.; PARAIBA, L. C., TORNISIELO, V. L. Bioconcentration of richlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere**, 64:56-62, 2006.

LU, F. C. **Basic toxicology: Fundamentals, target organs and risk assessment**. Taylor & Francis ed., Washington (USA), 80p. 1996.

LUVIZOTTO-SANTOS, R. NOELIA, E.M.; ESPINDOLA, E.L.G.; VIEIRA, E.M. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **Boletim Instituto Pesca**, 35:343 – 358, 2009.

MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, 28:159-163, 2006.

MACEDO,C.L.; MARTINS, E.S.; MACEDO, L. L.P.; SANTOS, A.C.; PRAÇA, L.B.; GÓIS, L.A.B.; MONNERAT, R.G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesq. agropec. Bras**, 47:1759-1765, 2012.

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia. Instituto de Tecnologia ed., Rio de Janeiro (RJ), 320p. 2012.

MARIANO, W.S.; MORON, S.E.; GARCIA, R.G., TAVARES-DIAS. Impactos de pesticidas e biopesticidas na aquicultura. In: TAVARES- DIAS, M. & MARIANO, W.S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Editora Pedro & João, São Carlos (SP), 345p. 2015.

MARQUES, D. K. S. Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Curvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, **Tese de Doutorado**. UFSCar, São Carlos (SP), 66p. 2003.

MARTINS, A. L.; VIVAN, R. H. F.; SANTOS, F. P. Caracterização Genética de Novos Isolados Bacterianos com Potencial Entomopatogênico. **Revista Terra & Cultura**, 58:11-18, 2014

MARTINS, M. L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; BOZZO, F.R.; PAIVA, A.M.F.C.; GONÇALVES, A. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the state of São Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum Biology Science**, 24:981-985, 2002.

MARTINS, E.S.; MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P. R.; DUMAS, V.F.; BRAZ, S.V.; AGUIAR, R.W.S.; GOMES, A.C.M.M.; SANCHEZ, J.; BRAVO, A.; RIBEIRO, B.M. Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 40:138-145, 2010.

MATAQUEIRO, M. I. Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl paration no pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887). **Dissertação de Mestrado**. UNESP, Jaboticabal (SP), 47p. 2002.



MATAQUEIRO, M. I.; NAKAGHI, L.S.; YAMADA, P.K.; FERRAZ, G.C.; QUEIROZ-NETO, A.; DE OLIVEIRA, G.H. Degradation, Residual Determination, and Cholinesterase Activity of Triclorfon in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (pacu) 1887. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 77:125-132, 2014.

MATAQUEIRO, M. I.; NAKAGHI, L.S.O.; SOUZA, J.P.; CRUZ, C.; OLIVEIRA, G.H.; URBINATI, E.C. Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon. **Journal of Applied Ichthyology**, 25:124–127. 2009.

MAXIMIANO, A. A.; FERNANDES, R. O.; NUNES, F. P.; ASSIS, M. P.; MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G.; OLIVEIRA-FILHO, E. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicos e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos à saúde humana e ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, 10(2):483-491, 2005.

NEMR, A. E.; ABD-ALLAH, A. M. A. Organochlorine contamination in some marketable fish in Egypt. **Chemosphere**, 54:1401-1406, 2004.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília (DF), 60p. 2013.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, J. L. (org.). **Controle Biológico**. Embrapa ed., Jaguariúna (SP). 368p. 2000.

MORAES, G.; MORAES, F.D.; VENTURINI, F.P.; ROSSI, P.A.; AVILEZ, I. M.; SOARES, C.A.P. O uso de piretroides na piscicultura: perspectivas e restrições. In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W.S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Editora Pedro & João, São Carlos (SP), 345p. 2015.

MORON, S.E.; POLEZ, V.L.P.; ARTONI, R.A.; RIBAS, J.L.C; TAKAHASHI, H.K. Estudos de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* expostos ao herbicida Atrazina. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** 1(1):1-4, 2006.

MOURA, A. O. Síntese e aplicação de magadiíta na liberação controlada de herbicidas. **Dissertação de Mestrado**. UNB, Brasília (DF), 126p. 2008.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** 3:1-7, 2008.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P.N.; MATTOS, R. C. O. C.; MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 35(2):130-135, 2001.

ONO, E.A., HALVERSON, M.R.; KUBITZA, F. Pirarucu: O gigante esquecido. **Panorama da Aquicultura**, 81:14-25, 2004.

- OPUSZYNSKI, K.; SHIREMAN J. V.; ALDRIDGE F.J.; ROTTMANN, R.W. Environmental manipulation to stimulate rotifers in fish rearing ponds. **Aquaculture**, 42:343- 348, 1984.
- PAVANELLI, G. C. J.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Eduem, Maringá (PR), 305p. 2002.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Eduem, Maringá (PR), 264p. 1999.
- PEHKONEN, S. O.; ZHANG, Q. The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 32:17-72, 2002.
- PEREIRA-FILHO, M., CAVERO, BRUNO ADAN SAGRATZKI, ROUBACH, RODRIGO, ITUASSÚ, DANIEL RABELLO, GANDRA, ANDRÉ LIMA, & CRESCÊNCIO, ROGER. Cultivo do Pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado. **Acta Amazônica**, 33(4):715-718, 2003.
- PETRY, F.; LOZOVEI, A. L.; FERRAZ, M. E.; SANTOS NETO, L. G. Controle integrado de espécies de Simulium (Diptera, Simuliidae) por *Bacillus thuringiensis* e manejos mecânicos no riacho e nos vertedouros de tanques de piscicultura, Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Entomol.**, 48(1):127-132, 2004.
- PIEIDADE, M. T. F.; ALMEIDA E VAL, V. M. F. D.; LOPES, A.; HENRIQUE, H. S.; FÉ, L. M. L.; WITTMANN, F. Organismos aquáticos e de áreas úmidas em uma Amazônia em transição. **Ciência e Cultura**, 66(3):34-40, 2014.
- POLANCZY, R., ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, 8:1-10, 2003.
- POLEKSIĆ, V., MITROVIĆ-TUTUNDŽIĆ, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. (org.), Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish, Oxford (UK), 352p. 1994.
- RAMOS, C. A. Caracterização Morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas*, durante a transição da respiração aquática para respiração aérea. **Dissertação de Mestrado**. UFSCAR, São Carlos, (SP) 79p. 2008.
- RANZANI-PAIVA, M.J.; ISHIKAWA, C.M.; PORTELLA, M.C.; CELIBERTO, R.J. Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2,-tricloroetilo (Neguvon). **Boletim do Instituto de Pesca**, 14:83-92, 1997.
- RAO, K.S., RAO, K.V. Impact of methyl parathion toxicity and serine inhibition on acetyl cholinesterase activity in tissues of the teleost (*Tilapia mossambica*) – a correlative study. **Toxicology Letters**, 22:351-364, 1984.
- RODRIGUES E. L.; RANZANI – PAIVA, M. J.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L.; EIRAS, A. C. Efeito agudo do organofosforado Diptorex 500 (Trichlorfon) em baço de

curimbatá *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 24:197-203, 1997.

RODRIGUES E. L.; RANZANI – PAIVA, M. J.; PACHECO, F.J.; VEIGA, M.L. Histopathologic lesions in the liver of *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to a sublethal concentrations of the organophosphate insecticide Dipterex 500® (Trichorfon). **Acta Scientiarum**, Maringá, 23(2):503-505, 2001.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E.; RODRIGUES, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia**. Curitiba, 15(2):441-450, 1998.

SALDANHA, G.C. TORRES, J.P.M.; BASTOS, W.R.; D'ÁMATO, C. Diclorodifeniltricloroetano (DDT) no tecido muscular de peixes capturados na bacia do rio madeira, Rondônia. **REDI**, 1(1):18-29, 2013.

SANTIAGO, P. C. Seletiva de Inseticida Usados na Agricultura. **Ciência Hoje**, 22 17 - 24, 1986.

STRAUS, D.L.; CHAMBERS, J.E. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion and S.S.S. - tributyl phosphorotrithioate (DEF). **Aquatic Toxicology**, 33(3):311-324, 1995

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S; PAWERT, M; HONNEN, W; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **J. Aquat. Ecosyst**, 6:75-86, 1997.

SELVIK, A.; HANSEN, P.K.; ERVIK, A.; SAMUELSEN, O.B. The stability and persistence of diflubenzuron in marine sediments studied under laboratory conditions and the dispersion to the sediment under a fish farm following medication. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, 285:237-245, 2002.

SENHORINI, J.A.; FONTES, N.A.; LUCAS, A.F.B.; SANTOS Jr., S. Larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887, (Pisces, Characidae) em viveiros com e sem organofosforado (Folidol 60%). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, 4(2):11-22, 1991.

SERRANO, R.; HERNÁNDEZ, J.B.; DOSDA, V.; CANALES, J. Toxicity and bioconcentration of selected organophosphorus pesticides in *Mytillus galloprovincialis* and *Venus gallina*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, 29:284-290, 1995.

SHEPHERD, J. Fish health and disease. In: SHEPHERD, J.; BROMAGE, N.R. (orgs.) Intensive Fish Farming. **Blackwell Science**. Oxford (UK), 404p. 1995.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, 128:215-228, 2002.

SPADOTTO, C. A.; MATALLO, M. B.; GOMES, M. A. F. Sorção do Herbicida 2,4-D em solos brasileiros. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 13:103-110, 2003.

SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, N. N. Effects of acute exposure to metil-paration on carbohydrate metabolism of Indian catfish (*Heteropneustes fossilis*). **Acta Pharmacol Toxicol**, 48:26-31, 1981.

TAVARES-DIAS M.; ARAUJO, C.S.O.; BARROS, M.S.; VIANA, G.M. New hosts and distribution records of *Braga patagonica*, a parasite cymothoidae of fishes from the Amazon. **Braz J Aquat Sci Technol**, 1:91-97. 2014.

TAVARES-DIAS, M.; NEVES, E.F.; SANTOS, E.F.; DIAS, M.K.R.; MARINHO, R.G.B.; ONO, E.A. *Perulernaea gamitanae* (Copepoda: Lernaecidae) parasitizing tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characidae) and the hybrids tambacu and tambatinga, cultured in Northern Brazil. **Arq. Bras Med. Vet. Zoot.** 6:988-995, 2011.

THOMAZ, J. M.; MARTINS, N.D.; MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON). **Ecotoxicology Environ Safety**, 72:1413-24, 2009.

TRAUS, D. L.; CHAMBERS, J. E. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterase of fingerling channel *catfish* by chlorpyrifos, parathion and SSS-tributy phosphotriothioate (DEP). **Aquatic Toxicology**, 33:311-324, 1995.

TSUDA, T.; AOKI, S.; KOJIMA, M. FUJITA, T. Accumulation and excretion of organophosphorus pesticides by willow shiner. **Chemosphere**, 25:1945-1951, 1996.

UDROIU I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicol**, 79:201–204, 2006.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Zoophysiology: Fishes of the Amazon and Their Environment – Physiological and Biochemical Aspects**. Springer – Velag Berlin (DEU), 32: 2226p. 1995.

VARÓ, I.; SERRANO, R.; PITARCH, E.; AMAT, F.; LÓPES, F.J.; NAVARRO, J.C. Toxicity and bioconcentration of Chorpyrifos in aquatic organisms: *Artemia parthenogenetica* (Crustacea), *Gambusia affinis*, and *Aphanius iberus* (Pisces). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 65: 623-630, 2000.

VENTURINI, F. P., MORAES, MORAES, F.D., CORTELLA, L. R. X., ROSSI, C. C., MORAES, G. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish Physiol. Biochem.** 41(1):299-309, 2015.

VILAS-BOAS, G.; ALVAREZ, R.C.; SANTOS, C.A; VILAS-BOAS, L. A. Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis** 5(1): 1-10, 2012.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M. e PEAKALL, D.B. **Principles of ecotoxicology**. Taylor & Francis, London. 321p. 1996.

WENDELAAR BONGA, S. E. **The Stress Response in Fish**. Physiology Review ed. 625p. 1997.

## PROBLEMAS

A utilização de biopesticidas a base do *B. thuringiensis* na agricultura é inerente e essencial para o sucesso da disponibilidade de alimentos. Quais os possíveis efeitos fisiológicos e histológicos nas brânquias, fígado, rim e intestino de *A. gigas* e *P. mesopotamicus* alimentados com dietas contendo biopesticida a base do *B. thuringiensis*? Período curto de alimentação (48 h) é mais prejudicial à saúde desses peixes? Banhos curtos (24 h) e prolongados (48 h) em água contendo *B. thuringiensis* (biopesticidas) causam alterações fisiológicas em *A. gigas* e *P. mesopotamicus*? Esse biopesticida pode agir diretamente no intestino de *A. gigas* e *P. mesopotamicus* contaminando-os com a bactérias *B. thuringiensis*? Essas questões norteiam o presente estudo.

## HIPÓTESES

H<sub>1</sub>. Após 24 e 48 h da alimentação com dietas contendo biopesticida a base de *B. thuringiensis* ocorrem alterações estruturais no fígado, rim e intestino *A. gigas*, uma vez que biopesticida a base dessa bactéria pode causar danos a invertebrados e infecção em vertebrados aquáticos;

H<sub>2</sub>. Após 24 e 48 h da alimentação com dietas contendo biopesticida a base de *B. thuringiensis* ocorrem alterações fisiológicas em *P. mesopotamicus* e *A. gigas*, devido a alterações estruturais em órgãos desses peixes;

H<sub>3</sub>. As concentrações do biopesticida a base de *B. thuringiensis* usadas na dieta e banhos para *P. mesopotamicus* e *A. gigas*, durante 48 h, causam maiores danos estruturais e fisiológicos nesses peixes, porque maior tempo de alimentação e exposição a esse biopesticida são mais prejudiciais à saúde desses peixes.

## OBJETIVOS

### 1. GERAL

Investigar os efeitos fisiológicos (sanguíneos e bioquímicos) e histológicos em *P. mesopotamicus* e *A. gigas* expostos a biopesticida a base de *B. thuringiensis*.

### 2. ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar os efeitos hematológicos (eritrograma, leucograma e trombograma) desencadeados em *P. mesopotamicus* e *A. gigas* após banho ou alimentação (ambos os tratamentos por 24h e 48h) com biopesticida a base de *B. thuringiensis*;
- ✓ Determinar o perfil bioquímico (perfil nutricional, enzimas hepáticas, íons e mediadores de estresse) em *P. mesopotamicus* e *A. gigas* após banho ou alimentação (ambos os tratamentos por 24h e 48h) com biopesticida a base de *B. thuringiensis*;
- ✓ Avaliar as alterações histológicas (intestino, fígado e rins) em *A. gigas* após banho ou alimentação (ambos os tratamentos por 24h e 48h) com biopesticida a base de *B. thuringiensis*.

**ARTIGO 1**

**Parâmetros fisiológicos e morfológicos de *Arapaima gigas* (Arapaimidae) exposto a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.**

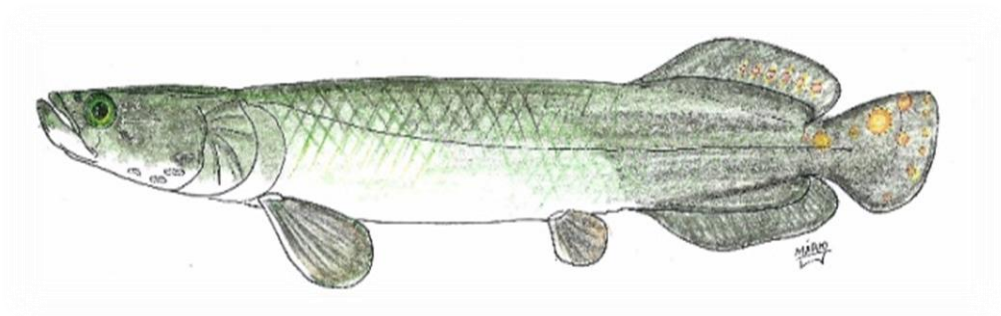


Ilustração: Mário Júnior Saviato



**Parâmetros fisiológicos e morfológicos de *Arapaima gigas* (Arapaimidae) expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis***

Wagner dos Santos Mariano<sup>1,3\*</sup>; Jefferson de Oliveira Lima<sup>2</sup>; Marcela Alves Santuci<sup>3</sup>; Liana Bezerra Dias de Lima<sup>3</sup>; Sandro Estevan Moron<sup>3</sup>; Marcos Tavares-Dias<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-BIONORTE), Macapá, AP, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Rio Claro. Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína. Araguaína, TO, Brasil.

<sup>4</sup> Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brasil.

\*Autor correspondente: Wagner dos Santos Mariano.

Email: [wagnermariano@uft.edu.br](mailto:wagnermariano@uft.edu.br)

## RESUMO

Biopesticidas a base *Bacillus thuringiensis* tem sido usados na agricultura contra larvas de insetos que são consideradas pragas no cultivo de soja, milho e algodão. São considerados inócuos a organismos não-alvos, como é o caso dos vertebrados aquáticos. Este estudo teve por objetivo investigar os efeitos de biopesticida à base de *B. thuringiensis* na histologia do fígado, rim e intestino e na fisiologia dos peixes expostos. Nos ensaios, o biopesticida foi adicionado a água dos tanques de cultivo e na alimentação dos peixes, durante 24 e 48 horas. Para os ensaios foi utilizado a variedade de *B. thuringiensis* var. *kurkaki* que contém esporos da bactéria. Foi adicionado 0,13 g desse biopesticida por kg de ração comercial nas dietas contendo o biopesticida. Para os peixes submetidos ao biopesticida diretamente na água dos tanques foi adicionado 20 mg/L do biopesticida. Os peixes submetidos a *B. thuringiensis*, na água dos tanques de cultivo e na alimentação, apresentaram ajustes sanguíneos caracterizados por alterações (aumentos ou reduções) no eritrograma (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos), trombograma, leucograma, perfil bioquímico plasmático (sódio, cloreto, potássio, colesterol, glicose, triglicerídeos, cortisol proteínas totais) e enzimático (Aspartato Amino Transferase e Alanina Amino Transferase). As alterações histopatológicas foram caracterizadas pela presença de vacuolizações citoplasmáticas, hipertrofias e atrofia nucleares, centros de melanomacrófagos no fígado e rim, além nas modificações histológicas nas vilosidades e células intestinais. Tais alterações fisiológicas e histopatológicas foram moderadas; porém, como concentrações mais elevadas podem ser mais nocivas à saúde dos peixes, o produtor deve estar atento à dispersão desses produtos agrícolas para a piscicultura. Portanto, ou o uso de biopesticida a base de *B. thuringiensis* deve ser parcimonioso.

**Palavras-Chave:** Pirarucu. Hematologia. Bioquímica. Histopatologia.

## INTRODUÇÃO

Não é possível ignorar que devido ao uso de agrotóxicos ou pesticidas alimentos são produzidos em larga escala, para alimentar a população mundial que não para de crescer. Porém, em geral, esses são extremamente tóxicos e aumentam a poluição ambiental (WIEGAND et al., 1999, CHAPADENSE et al., 2009) modificando as características naturais dos ecossistemas.

Os ecossistemas terrestres e aquáticos apresentam agentes bióticos e abióticos que podem ser alterados com a inserção de substâncias químicas, causando modificações na composição do solo, eliminando espécies (vegetais e animais) nativas e propiciando a proliferação de espécies invasoras, que alteram as interações ecológicas do local. Assim, surgiram novas estratégias que tentam minimizar os efeitos nocivos dos pesticidas químicos ao meio ambiente, dentre eles estão os biopesticidas (SCHLENK, 2015).

Os biopesticidas podem ser substâncias naturais que controlam pragas (pesticidas bioquímicos), microrganismos que controlam pragas (pesticidas microbianos) ou substâncias pesticidas produzidas por plantas que contêm material genético adicionado (plantas geneticamente modificadas - PGM). Essas novas formas de controle de pragas da agricultura prometem minimizar os efeitos nocivos ao ambiente, por se tratarem de produtos que já existem na natureza. Um dos inseticidas biológicos mais conhecidos e utilizados atualmente tem sido o que utiliza a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 em sua composição, que trata-se de uma bactéria gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica e naturalmente encontrada no solo (BOBROWSKI et al., 2003). Essa bactéria destaca-se como agente vantajoso e seguro para o controle biológico de insetos, por ser altamente específica e não apresentar atividade tóxica a mamíferos, além de ser responsável por mais de 90% dos biopesticidas disponíveis em todo o mundo (POLANCZYK, 2004; MARIANO et al., 2015). Porém, as redes hidrográficas localizadas próximas a áreas agrícolas e viveiros de cultivo podem ser contaminadas com esses compostos, causando a intoxicação de organismos aquáticos.

Dentre as práticas agropecuárias, a piscicultura está em crescente expansão, uma vez que contribui para a produção de alimentos com elevado teor de proteína e renda. Porém, o uso indiscriminado e inadequado de biopesticidas no entorno dos sistemas de produção aquícola constitui uma ameaça para os peixes e outros organismos, devido a contaminação dos peixes, organismos não-alvos (JONSSON et al., 2014).

Os ingredientes ativos dos agrotóxicos possuem propriedades que lhes conferem diferentes graus de persistência ambiental, mobilidade e potenciais tóxicos. A movimentação destes compostos no ambiente da área agrícola depende de fatores tais como a volatilização, escoamento superficial, lixiviação, fluxo preferencial e características de relevo, causando a incidência de 2 a 90% dos agrotóxicos das áreas agrícolas na rede hidrográfica local (JARDIM e ANDRADE, 2009; KUGLER, 2012). Portanto, é possível que o uso de biopesticida a base de *B. thuringiensis* para ambiente que não o possui pode gerar problemas para o organismo de *Arapaima gigas*? Assim, este estudo investigou os efeitos fisiológicos e histopatológicos da exposição de *A. gigas*, via água e alimentação, a um biopesticida a base de *B. thuringiensis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 60 juvenis de *A. gigas* ( $531,7 \pm 153,9\text{g}$ ) obtidos de piscicultura comercial de Araguaína, estado de Tocantins (Brasil) e transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Araguaína (TO). Os peixes foram aclimatados durante 30 dias em tanques de 500 L de água. Durante a aclimação foi utilizada aeração constante e condições controladas de temperatura ( $\pm 25\text{ }^\circ\text{C}$ ) e pH ( $\pm 7,0$ ).

### Procedimento de adição da bactéria *Bacillus thuringiensis* na ração

Neste ensaio, a variedade no biopesticida (Dipel<sup>®</sup>-WP- Sumitomo chemical, Brasil) utilizado foi *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que contém esporos dessa bactéria. Foi adicionado 0,13 g desse biopesticida por kg de ração comercial para peixes carnívoros, contendo 45% de proteína bruta (PB). Foram preparadas soluções aquosas de 20 mg/L do biopesticida para imergir cada 150 g da ração comercial durante 15 minutos. Após a imersão da ração nessa solução contendo o biopesticida, essas rações foram colocadas para secar em estufa microbiológica a 37°C, durante por 12 horas, e para ativação dos esporos de *B. thuringiensis*. Foram feitos testes de crescimento bacteriano, após esse procedimento, para certificação da presença do *B. thuringiensis* na ração. Em seguida, as rações foram usadas para alimentar os peixes, durante 24 ou 48 h.

### **Procedimento de adição do biopesticida na água e dieta de *Arapaima gigas***

Dois ensaios foram realizados com a adição do biopesticida à base de *B. thuringiensis*: na ração de *A. gigas* e com a exposição do biopesticida na água dos tanques.

Para os grupos que foram submetidos ao biopesticida diretamente no ambiente aquático (Grupo Água), foram calculados o valor referente a 20 mg do biopesticida para cada litro de água do tanque (20 mg/L). Como cada tanque de 500 litros foram adicionados 10 g do biopesticida.

Para os peixes que receberam dieta contendo o biopesticida (Grupo Ração) foi adotado o seguinte procedimento:

Uma ração comercial para peixes carnívoros contendo 45% de proteína bruta (PB) foi usada para adicionar 0,13 g do biopesticida Dipel®-WP/L para cada kg de dieta, contendo os esporos de *B. thuringiensis*, e usada para alimentar *A. gigas*. Essa ração contendo os esporos foi preparada da seguinte forma:

Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas de 20 mg/L do biopesticida para imergir cada 150 g da ração comercial durante 15 minutos. Após a imersão da ração nessa solução contendo o biopesticida, as rações foram colocadas para secar em estufa microbiológica a 37°C, durante 12 horas, e para ativação dos esporos da bactéria *B. thuringiensis*. Após esse período, as rações foram usadas para alimentar os peixes, durante 24 ou 48 h. A preparação da ração foi feito diariamente, para evitar armazenamento.

Os peixes foram divididos em cinco grupos: 1) Grupo Controle; 2) Grupo ração 24h; 3) Grupo ração 48h; 4) Grupo água 24h; e 5) Grupo água 48h. Cada grupo com 12 peixes e 3 repetições. Os peixes do grupo controle foram alimentados a cada seis horas, durante 24 ou 48 horas com ração comercial sem o biopesticida, apenas umedecida com água e seca por 12 h em estufa. Os peixes do grupo ração foram alimentados a cada seis horas, durante 24 e 48 h, com as dietas contendo esporos do biopesticida Dipel®-WP. Os peixes do grupo água tiveram em contato, através da água de cultivo, com o biopesticida durante 24 e 48 horas.

### **Procedimentos de análises sanguíneas**

Amostras de sangue foram coletadas por punção do vaso caudal com seringas heparinizadas para determinação dos parâmetros sanguíneos. O hematócrito foi determinado, em duplicata, em tubo capilar heparinizado utilizando centrífuga para microhematócrito; a concentração de hemoglobina foi determinada de acordo com o método da formação de cianometahemoglobina utilizando espectrofotômetro e leitura em 540 nm e contagem do número de eritrócitos foi feita em câmara de Neubauer após a diluição do sangue em formol citrato a 4%. A partir desses dados foram determinados os índices hematimétricos: VCM (Volume Corpuscular Médio =  $\mu\text{m}^3$ ), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média = pg/célula), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média = %) (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

O sangue foi usado também para a confecção de extensões sanguíneas fixadas e coradas com o corante panótico rápido (Laborclin<sup>®</sup>). As extensões foram usadas para contagem diferencial de leucócitos e contagens de leucócitos e trombócitos totais em microscópio de luz (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

O sangue remanescente foi centrifugado para obtenção do plasma e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e usado para análises bioquímicas. O cortisol foi determinado usando do Kit DBC (CAN-E-270<sup>®</sup>) que permitiu determinação quantitativa direta de cortisol por enzima imunoensaio em soro, com leitura em 450 nm em leitora de microplacas. A concentração da glicose, lactato foi determinado, proteínas totais, colesterol e triglicérides foi determinada usando Kit Labtest (MG, Brasil) e leitura em espectrofotômetro. Os níveis dos íons potássio ( $\text{K}^+$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloretos ( $\text{Cl}^-$ ) foram determinados usando Kit Labtest (MG, Brasil) e leitura em espectrofotômetro. A atividade da Enzima Aspartato Amino Transferase (AST) e Enzima Alanina Amino Transferase (ALT) foi determinada por meio do Kit Labtest (MG, Brasil) e leitura em espectrofotômetro com comprimento de 340 nm.

### **Análises histopatológicas**

Ao término dos ensaios experimentais oito peixes de cada tratamento foram coletados aleatoriamente, anestesiados em água e gelo (5 minutos), para posterior por secção medular e coleta de fragmentos do intestino médio, fígado e rim, que foram fixados em Bouin. Os fragmentos foram desidratados em séries alcoólicas e diafanizadas para inclusão em parafina, seccionadas em cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$  de espessura e montados em lâminas histológicas. As lâminas histológicas foram coradas com

Hematoxilina e Eosina (HE), e examinadas em microscópio de luz, com câmara lio de fotográfica digital (LEYCA DM 500). Os quatro peixes restantes de cada tratamento, ficaram nos tanques para observação pós-experimentos.

As análises das alterações histopatológicas do fígado e rim foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento das funções do órgão: Alterações de Estágio I (não comprometem o funcionamento do órgão), Estágio II (mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão) e Estágio III (muito severas e irreversíveis). A análise histopatológica foi realizada de forma semiquantitativa usando o valor médio de alteração (VMA) (SCHWAIGER et al., 1997) e índice de alteração histopatológica (IAH) (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Para as análises das alterações histopatológicas no intestino médio foram também contadas, inicialmente, o número total de vilosidades verticais e horizontais em animais dos cinco tratamentos (controle, água 24 horas, água 48 horas, ração 24 horas e ração 48 horas). Posteriormente, foram contados os números de células caliciformes em cinco vilosidades verticais, e também o número de linfócitos em dez vilosidades horizontais em cada animal. A contagem de vilosidades foi realizada com objetiva de 100 x e a contagem de células caliciformes e linfócitos com objetiva de 40x em microscópio de luz.

### **Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  DP (Desvio padrão da média) e somente a diferença ao nível de 5% de significância foi considerada. Todos os dados dos parâmetros sanguíneo foram previamente avaliados nos pressupostos de normalidade e homocedasticidade usando Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para os dados com distribuição normal foi usando análise de variância (ANOVA - One Way) seguido do teste de Dunnet, para comparação entre médias.

## **RESULTADOS**

Em *A. gigas* expostos a água ou dieta contendo biopesticida à base de *B. thuringiensis* nenhum peixe morreu durante o período experimental e após 24 horas do experimento. Porém, com 48 horas iniciaram-se as mortes, que atingiram 100% de mortalidade em período de 168 horas (Tabela 1). Observar que previamente a mortes dos peixes, esses apresentaram natação lenta e errática.

**Tabela 1.** Mortalidade de *Arapaima gigas* durante e após exposição ao biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*.

Período	Ensaio		Ensaio
	Controle	Água	Ração
Durante o ensaio	0	0	0
24 horas após ensaio	0	0	0
48 horas após ensaio	0	0	1
72 horas após ensaio	0	1	0
96 horas após ensaio	0	2	1
120 horas após ensaio	0	0	2
144 horas após ensaio	0	1	1
168 horas após ensaio	0	1	0
Número total	0	5	5

Nos peixes expostos água ou dieta contendo biopesticida à base de *B. thuringiensis*, a concentração de hemoglobina não foi alterada ( $p > 0,05$ ), mas o hematócrito diminuiu ( $p < 0,05$ ) após 24 e 48 horas, quando comparado ao controle. O número de eritrócitos totais diminuiu ( $p < 0,05$ ) após 24 horas nos peixes expostos a água contendo biopesticida, mas aumentou ( $p < 0,05$ ) após 24 horas nos peixes alimentados com ração contendo *B. thuringiensis*, quando comparado aos controles. O VCM permaneceu inalterado no grupo 24 h água, mas aumentou ( $p < 0,05$ ) em 48 horas nos peixes mantidos em água contendo biopesticida, enquanto nos peixes alimentados com dieta contendo biopesticida houve redução ( $p < 0,05$ ) após 24 e 48 horas, quando comparado aos controles. O HCM aumentou ( $p < 0,05$ ) nos peixes expostos a água contendo a bactéria, no período de 24 e 48 horas, enquanto o CHCM aumentou ( $p < 0,05$ ) somente no grupo exposto após 24 horas em relação ao grupo controle (Tabela 2).



**Tabela 2.** Parâmetros hematológicos em *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

<b>Ensaio na água</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Hematócrito (%)	31,5±2,1 <sup>a</sup>	24,5±2,1 <sup>b</sup>	27,7±1,9 <sup>b</sup>
Hemoglobina (g/dL)	5,9±0,3 <sup>a</sup>	6,3±0,5 <sup>a</sup>	6,0±0,5 <sup>a</sup>
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /μL)	1,8±0,1 <sup>a</sup>	1,6±0,09 <sup>b</sup>	1,7±0,1 <sup>a</sup>
VCM (μm <sup>3</sup> )	160,3±7,5 <sup>a</sup>	161,5±7,5 <sup>a</sup>	174,5±13,8 <sup>b</sup>
HCM (pg)	28,8±3,2 <sup>a</sup>	39,9±4,1 <sup>b</sup>	33,7±3,2 <sup>b</sup>
CHCM (g/dL)	18,7±1,8 <sup>a</sup>	25,8±2,5 <sup>b</sup>	19,7±1,7 <sup>a</sup>
<b>Ensaio na ração</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Hematócrito (%)	31,5±2,1 <sup>a</sup>	25,8±2,9 <sup>b</sup>	27,2±1,3 <sup>b</sup>
Hemoglobina (g/dL)	5,9±0,3 <sup>a</sup>	5,9±0,3 <sup>a</sup>	6,3±0,3 <sup>a</sup>
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /μL)	1,8±0,1 <sup>a</sup>	2,0±0,2 <sup>b</sup>	1,8±0,1 <sup>a</sup>
VCM (μm <sup>3</sup> )	160,3±7,5 <sup>a</sup>	129,1±17,8 <sup>b</sup>	141,3±14,1 <sup>b</sup>
HCM (pg)	28,8±3,2 <sup>a</sup>	28,3±3,9 <sup>a</sup>	28,2±2,4 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	18,7±1,8 <sup>a</sup>	19,4±2,1 <sup>a</sup>	19,7±1,6 <sup>a</sup>

Valores expressam média ± desvio padrão. VCM: Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o controle, de acordo com ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett.

Em peixes expostos a água contendo biopesticida a base *B. thuringiensis* o número de trombócitos totais aumentou ( $p < 0,05$ ) após 24 horas, reduzindo após 48 horas ( $p < 0,05$ ), mas nos peixes alimentados com esse biopesticida não houve alterações ( $p > 0,05$ ) no número de trombócitos, quando comparado aos controles. Após 48 horas da exposição dos peixes em água contendo biopesticida a base *B. thuringiensis* houve redução ( $p < 0,05$ ) no número de leucócitos totais, enquanto nos peixes que receberam dieta contendo o biopesticida houve aumento ( $p < 0,05$ ) após 24 e 48 horas. A adição do biopesticida na água causou aumento ( $p < 0,05$ ) do número de linfócitos dos peixes após 24 horas e redução ( $p < 0,05$ ) após 48 horas da exposição, e também redução ( $p < 0,05$ ) após 24 e 48 horas em peixes alimentados com biopesticida.

O número de neutrófilos diminui ( $p < 0,05$ ) após 24 e 48 horas nos peixes expostos a água contendo biopesticida e nos peixes alimentados com o biopesticida após 48 horas. O número de monócitos diminui ( $p < 0,05$ ) nos peixes expostos a água contendo biopesticida e aumentou após 48 h, enquanto nos peixes que receberam dieta com biopesticida houve uma redução ( $p < 0,05$ ), quando comparado aos controles. Em peixes expostos a água contendo biopesticida ou alimentados com ração contendo biopesticida o número de eosinófilos não foi alterado ( $p > 0,05$ ), enquanto o número de LG-PAS aumentou ( $p < 0,05$ ) após 24 horas nos peixes expostos a água com o biopesticida (Tabela 3).

**Tabela 3.** Trombograma e Leucograma de *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

<b>Ensaio na água</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Trombócitos ( $\mu\text{L}$ )	191.439 $\pm$ 26.052 <sup>a</sup>	252.176,3 $\pm$ 2.901 <sup>b</sup>	131.998 $\pm$ 128.775 <sup>b</sup>
Leucócitos ( $\mu\text{L}$ )	257.939 $\pm$ 25.744 <sup>a</sup>	264.671 $\pm$ 23.039 <sup>a</sup>	75.936 $\pm$ 32.306 <sup>b</sup>
Linfócitos ( $\mu\text{L}$ )	81.684 $\pm$ 20.651 <sup>a</sup>	152.489 $\pm$ 15.953 <sup>b</sup>	48.419 $\pm$ 19.261 <sup>b</sup>
Neutrófilos ( $\mu\text{L}$ )	100.791 $\pm$ 2.441 <sup>a</sup>	52.293 $\pm$ 15.311 <sup>b</sup>	28.581 $\pm$ 14.105 <sup>b</sup>
Monócitos ( $\mu\text{L}$ )	48.817 $\pm$ 7.286 <sup>a</sup>	24.864 $\pm$ 7.303 <sup>b</sup>	52.78 $\pm$ 2.456 <sup>b</sup>
Eosinófilos ( $\mu\text{L}$ )	4.311 $\pm$ 1.508 <sup>a</sup>	4.107 $\pm$ 1.244 <sup>a</sup>	3.929 $\pm$ 2.474 <sup>a</sup>
LG-PAS ( $\mu\text{L}$ )	4.638 $\pm$ 1.417 <sup>a</sup>	12.419 $\pm$ 2.164 <sup>b</sup>	2.977 $\pm$ 2.454 <sup>a</sup>
<b>Ensaio na ração</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Trombócitos ( $\mu\text{L}$ )	191.439 $\pm$ 26.052 <sup>a</sup>	225.570,7 $\pm$ 49.109 <sup>a</sup>	196.332 $\pm$ 47.414 <sup>a</sup>
Leucócitos ( $\mu\text{L}$ )	257.939 $\pm$ 25.744 <sup>a</sup>	199.639 $\pm$ 54.734 <sup>b</sup>	105.371,3 $\pm$ 42.869 <sup>b</sup>
Linfócitos ( $\mu\text{L}$ )	81.684 $\pm$ 20.651 <sup>a</sup>	75.510 $\pm$ 19.200 <sup>a</sup>	68.620 $\pm$ 11.914 <sup>a</sup>
Neutrófilos ( $\mu\text{L}$ )	100.791 $\pm$ 2.441 <sup>a</sup>	123.115 $\pm$ 2.4794 <sup>a</sup>	38.218 $\pm$ 21.361 <sup>b</sup>
Monócitos ( $\mu\text{L}$ )	48.817 $\pm$ 7.286 <sup>a</sup>	32.241 $\pm$ 6.665 <sup>b</sup>	21.868 $\pm$ 1.045 <sup>b</sup>
Eosinófilos ( $\mu\text{L}$ )	4.311 $\pm$ 1.508 <sup>a</sup>	5.334 $\pm$ 3.184 <sup>a</sup>	4.170 $\pm$ 1.925 <sup>a</sup>
LG-PAS ( $\mu\text{L}$ )	4.638 $\pm$ 1.417 <sup>a</sup>	3.982 $\pm$ 1.019 <sup>a</sup>	3.001 $\pm$ 2.854 <sup>a</sup>

Valores expressam média  $\pm$  desvio padrão. LG-PAS: Leucócito granular PAS-Positivo. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os controles, de acordo com ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett.

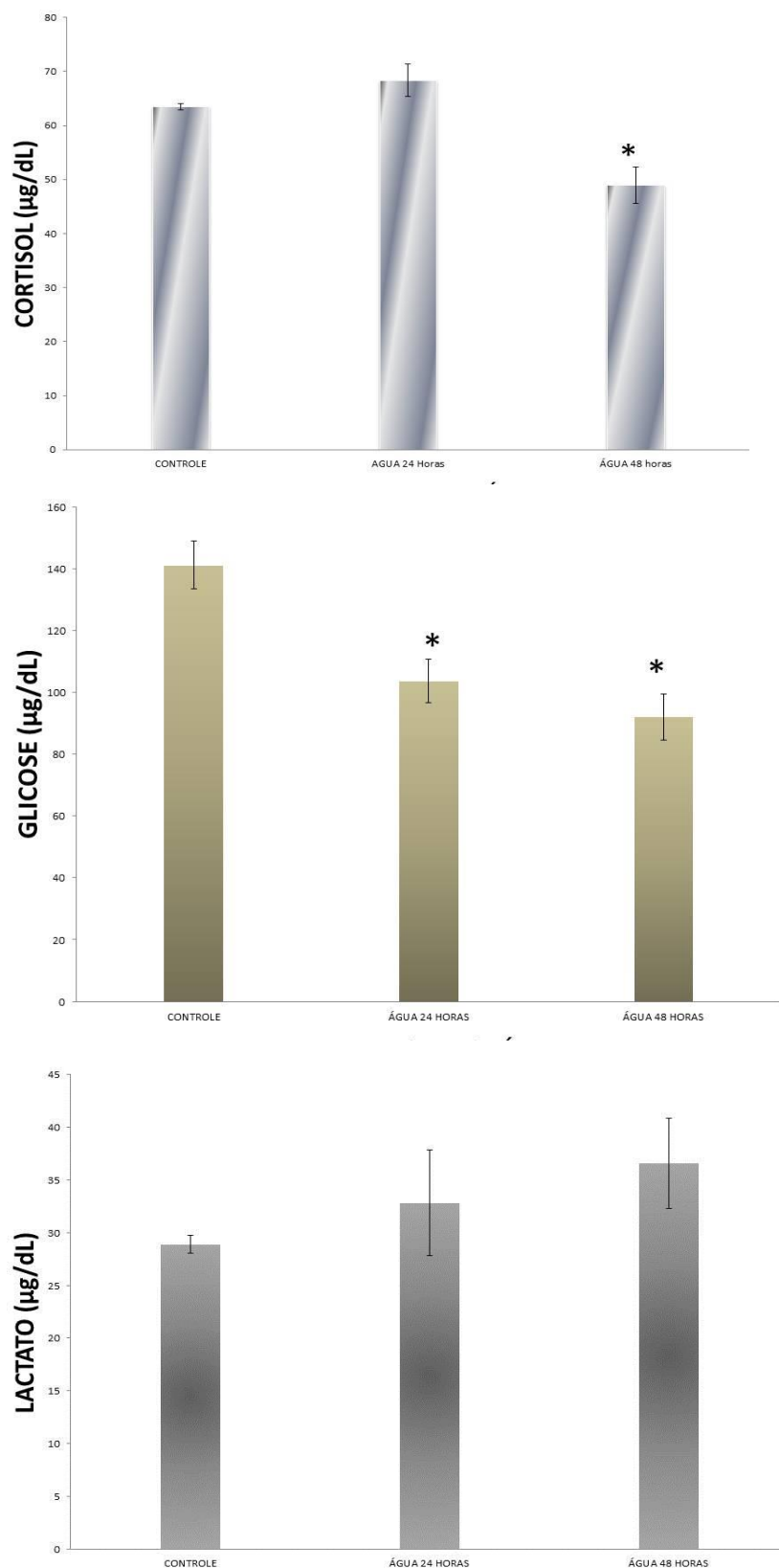
Em peixes expostos a água contendo biopesticida os níveis de proteínas totais, colesterol e triglicérides aumentaram ( $p < 0,05$ ) após 24 h da exposição, enquanto que nos peixes alimentados com dietas contendo biopesticida os níveis de proteínas totais, triglicérides e cloreto aumentaram ( $p < 0,05$ ) após 24 e 48 horas, quando comparado aos controles. Os níveis de sódio nos peixes expostos a água contendo biopesticida diminuíram ( $p < 0,05$ ) após 48 horas, enquanto os níveis de cloreto aumentaram ( $p < 0,05$ ) nesse mesmo período, quando comparado aos controles. Os níveis de potássio aumentaram ( $p < 0,05$ ) dos peixes expostos a água contendo biopesticida, mas não mostrou alterações ( $p > 0,05$ ) nos peixes que receberam ração contendo biopesticida, quando comparado ao controle. Os níveis de AST aumentaram ( $p < 0,05$ ) nos peixes expostos a água com biopesticida e nos alimentados com biopesticida após 48 horas, enquanto os níveis de ALT diminuíram nos peixes alimentados com biopesticida, quando comparados ao controle (Tabela 4).

Os níveis de cortisol plasmáticos diminuíram ( $p < 0,05$ ) após 48 horas da exposição dos peixes ao biopesticida, mas não houve qualquer alteração ( $p > 0,05$ ) nos peixes que receberam dieta contendo o biopesticida. Os níveis de glicose diminuíram ( $p < 0,05$ ) após 24 e 48 horas nos peixes expostos a água com biopesticida, mas não houve qualquer alteração ( $p > 0,05$ ) nos peixes que receberam dieta contendo o biopesticida, quando comparado aos controles. Porém, os níveis de lactato não mostraram qualquer alteração nos peixes expostos a água com biopesticida, ou peixes que receberam dieta contendo o biopesticida, quando comparado aos controles (Figuras 1 e 2).

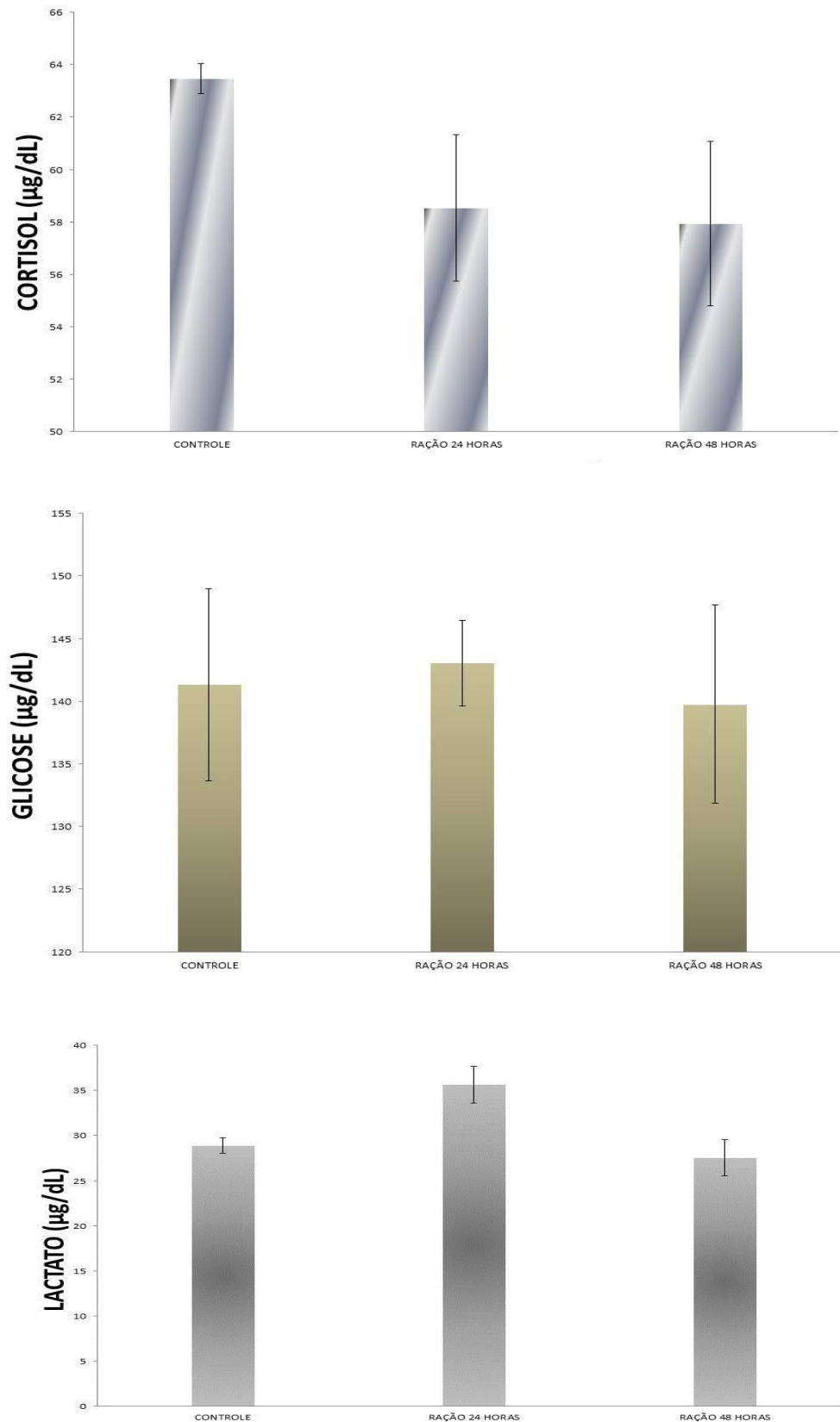
**Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos plasmáticos de *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

<b>Ensaio com água</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controles</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Proteínas totais (g/dL)	7,5±0,7 <sup>a</sup>	4,9±0,8 <sup>b</sup>	6,8±0,7 <sup>a</sup>
Colesterol (mg/dL)	168,1±13,8 <sup>a</sup>	201,7±23,5 <sup>b</sup>	176,2±17,6 <sup>a</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	92,9±15,0 <sup>a</sup>	121,2±14,1 <sup>b</sup>	115,4±15,1 <sup>a</sup>
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	182,1±9,5 <sup>a</sup>	196,2±14,3 <sup>a</sup>	174,6±16,1 <sup>b</sup>
K <sup>+</sup> (mmol/L)	14,5±1,3 <sup>a</sup>	20,4±4,5 <sup>b</sup>	12,4±1,6 <sup>a</sup>
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	132,3±9,6 <sup>a</sup>	129,5±14,8 <sup>a</sup>	161,9±5,0 <sup>b</sup>
AST (U/L)	15,8±6,6 <sup>a</sup>	22,3±10,7 <sup>a</sup>	43,4±17,4 <sup>b</sup>
ALT (U/L)	35,6±17,5 <sup>a</sup>	23,4±28,5 <sup>a</sup>	21,0±10,0 <sup>a</sup>
<b>Ensaio com ração</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controles</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Proteínas totais (g/dL)	7,5±0,7 <sup>a</sup>	7,9±1,1 <sup>b</sup>	4,8±0,6 <sup>b</sup>
Colesterol (mg/dL)	168,1±13,8 <sup>a</sup>	182,2±3,8 <sup>a</sup>	138,6±18,1 <sup>b</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	92,9±15,0 <sup>a</sup>	135,7±12,5 <sup>b</sup>	138,8±24,7 <sup>b</sup>
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	182,1±9,5 <sup>a</sup>	150,4±17,3 <sup>b</sup>	148,4±7,0 <sup>b</sup>
K <sup>+</sup> (mmol/L)	14,5±1,3 <sup>a</sup>	15,8±2,5 <sup>a</sup>	13,5±0,3 <sup>a</sup>
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	132,3±9,6 <sup>a</sup>	168,3±13,8 <sup>b</sup>	113,3±3,4 <sup>b</sup>
AST (U/L)	15,8±6,6 <sup>a</sup>	19,7±8,14 <sup>a</sup>	39,6±20,5 <sup>b</sup>
ALT (U/L)	35,6±17,5 <sup>a</sup>	15,3±12,0 <sup>b</sup>	12,3±11,1 <sup>b</sup>

Valores expressam média ± desvio padrão. AST: Enzima Aspartato Amino Transferase, ALT: Enzima Alanina Amino Transferase. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os controles, de acordo com ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett.



**Figura 1.** Concentração plasmática de cortisol, lactato e glicose em *Arapaima gigas* expostos a água com biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Valores expressam média e desvio padrão da média. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com ANOVA seguido do pós-teste Dunnett.



**Figura 2.** Concentração plasmática de cortisol, lactato e glicose em *Arapaima gigas* alimentados com dieta contendo biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Valores expressam média e desvio padrão da média. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com ANOVA seguido do pós-teste Dunnett.

Alterações histopatológicas hepáticas foram observadas em *A. gigas* expostos a água dos tanques com biopesticida e alimentados com ração contendo biopesticida, após 24 e 48 horas. Tais alterações hepáticas foram classificadas, na sua maioria, em estágios I e II (leve a moderada), mas necrose também ocorreu (Tabela 5).

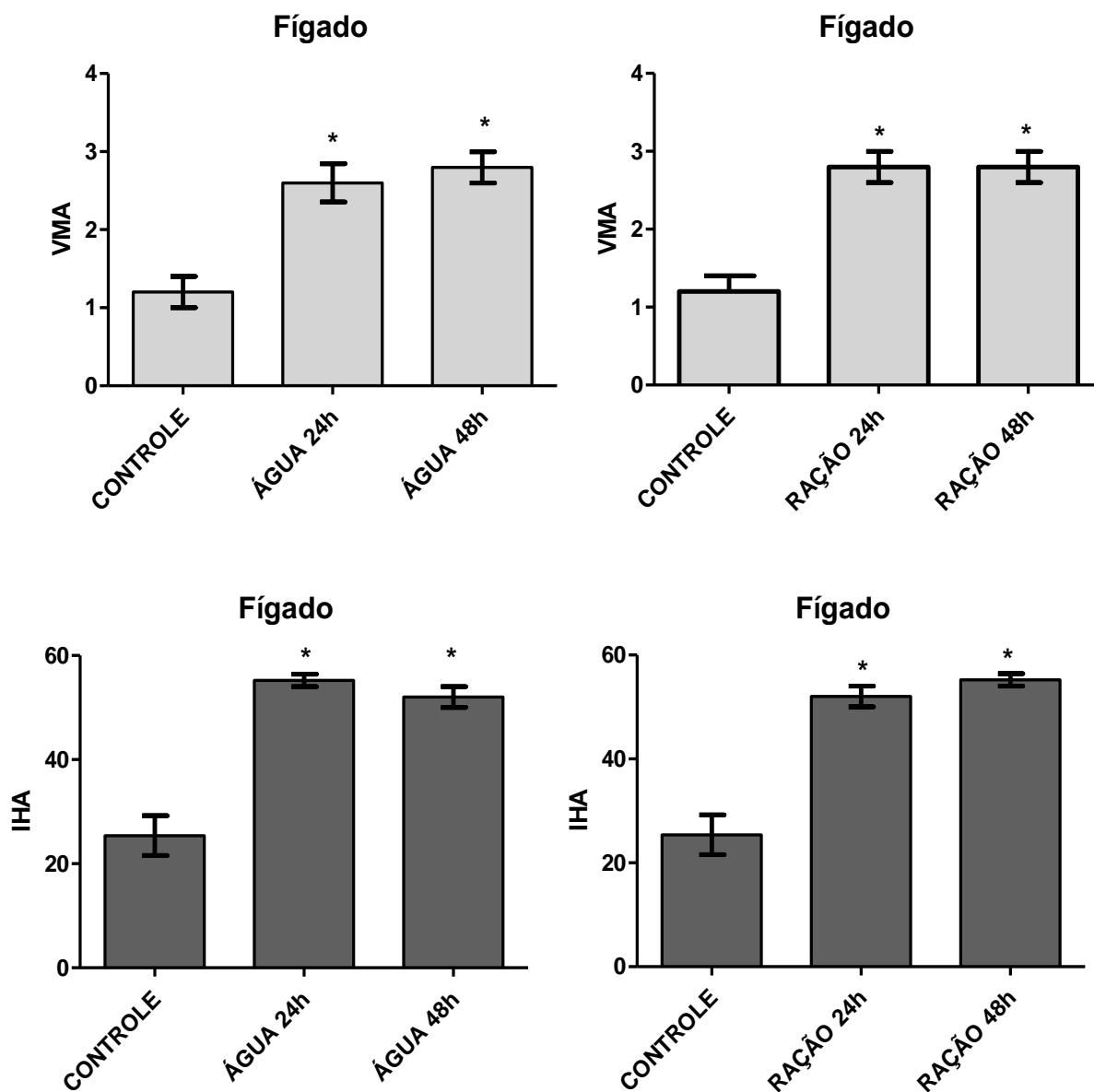
**Tabela 5.** Frequência das alterações histopatológicas no fígado de *Arapaina gigas* exposto a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

Estágio	Alterações	Controles	Água 24 h	Água 48 h	Ração 24h	Ração 48 h
I	Vacuolização citoplasmática	+	++	++	++	++
	Hipertrofia nuclear	0+	+	+	++	++
	Núcleo na periferia da célula	0+	++	+	++	++
	Desorganização hepática	+	+	0+	+	+
II	Atrofia nuclear	0+	0+	0+	+	+
	Vacuolização nuclear	0+	+	0+	0+	+
	Estagnação biliar	0+	+	+	+	+
	Degeneração nuclear	0	+	+	+	+
	Ausência de nucléolo	0+	0+	+	+	+
III	Necrose	0	0	0	0+	0+

0 alterações ausentes; 0+ alterações raramente frequentes; + alterações frequentes; ++ Alterações muito frequentes; +++ Alterações extremamente frequentes .

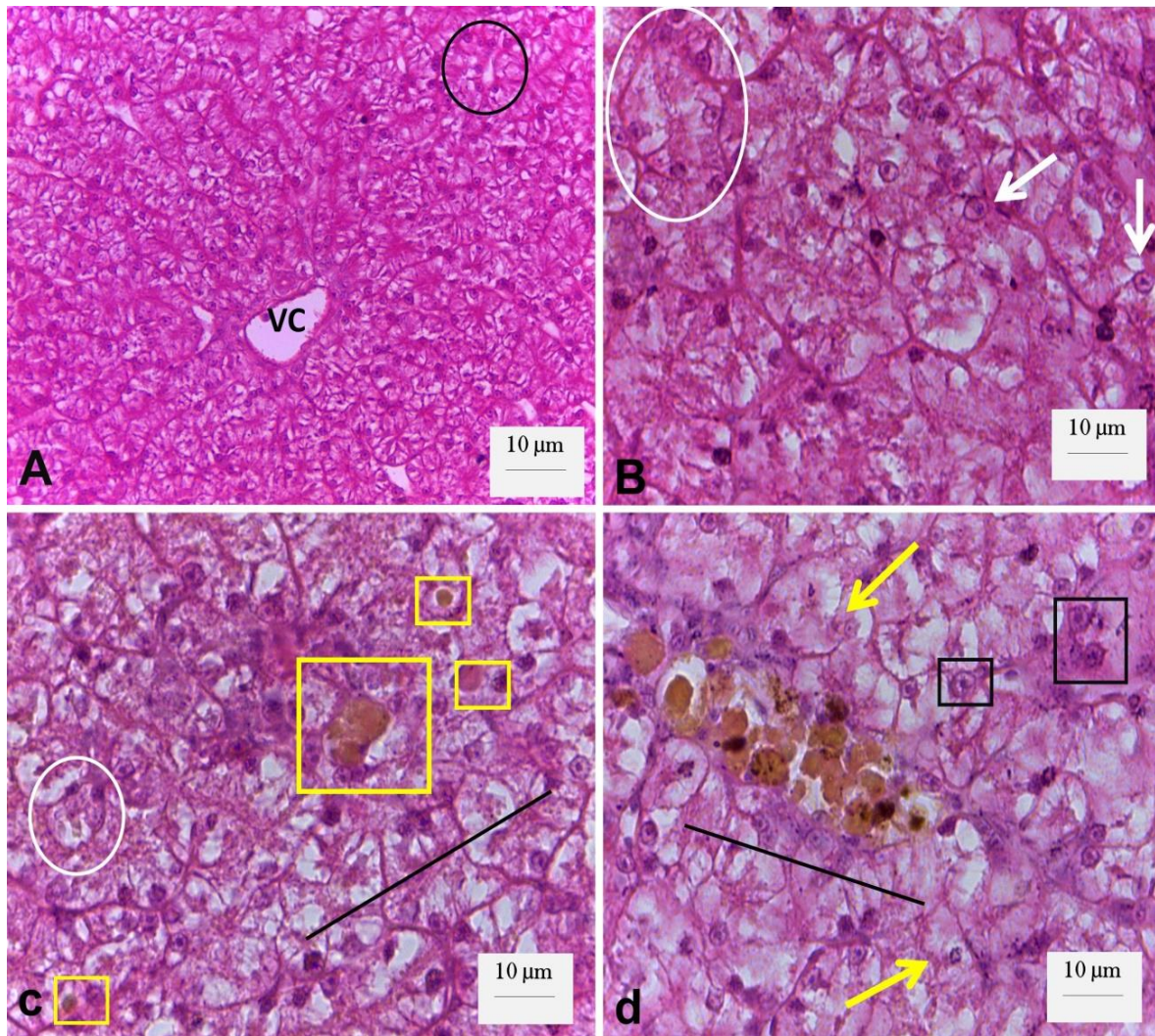
Em *A. gigas* expostos ao biopesticida na água dos tanques e alimentados com ração contendo biopesticida, após 24 e 48 horas, foi observado aumento ( $p < 0,05$ ) nos valores de IAH e VMA do fígado (Figura 3).

As principais alterações histopatológicas hepáticas encontradas em *A. gigas* expostos na água com biopesticida a base de *B. thuringiensis* e alimentados com ração contendo biopesticida, após 24 e 48 horas, são mostradas na Figura 4A-D.



**Figura 3.** Índice de alteração histopatológica (IAH) e valor médio de alteração (VMA) no fígado de *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Valores expressam média e desvio padrão da média. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), e acordo ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett.





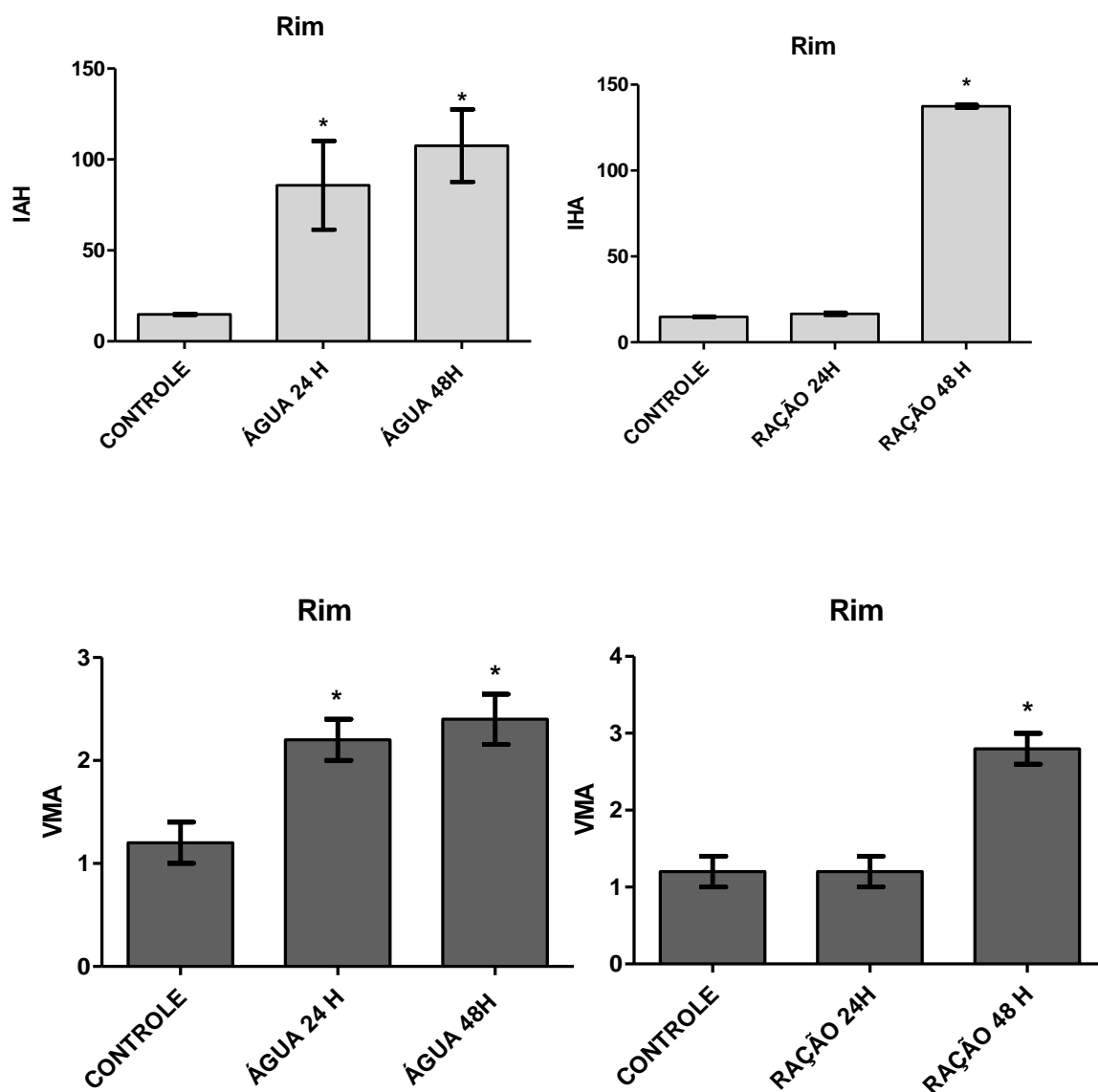
**Figura 4.** Alterações histopatológicas no fígado de *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. (A) Peixes controle, sem alterações histopatológicas, mostrando sinusóides (área circular) e veia central (VC). (B) Peixes expostos a água contendo biopesticida, após 24 horas, apresentando núcleos localizados na periferia da célula (área circular branca) e células com vacuolização nuclear (seta branca). (C) Peixes alimentados com dieta contendo biopesticida, após 48 horas, apresentando núcleos localizados na periferia da célula (área circular branca) e células com vacuolizaã (linha contínua preta) e estagnação biliar (área quadriculada). (D) Peixes alimentados com dieta contendo biopesticida, após 48 horas, apresentando células com hipertrofia nuclear (quadrado preto), atrofia nuclear (setas amarelas) e células com vacuolização (linha contínua preta). Coloração: Hematoxilina e Eosina.

As alterações histopatológicas renais observadas em *A. gigas* expostos a água e dieta contendo biopesticida foram classificadas em estágios (I, II e III), demonstrando lesões leves a severas (Tabela 6). Além disso, nesses peixes expostos ao biopesticida na água dos tanques e alimentados com ração contendo biopesticida, após 24 e 48 horas, foi observado aumento ( $p < 0,05$ ) nos valores de IAH e VMA do rim (Figura 5).

**Tabela 6.** Frequência das alterações histopatológicas no rim de *Arapaina gigas* exposto a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

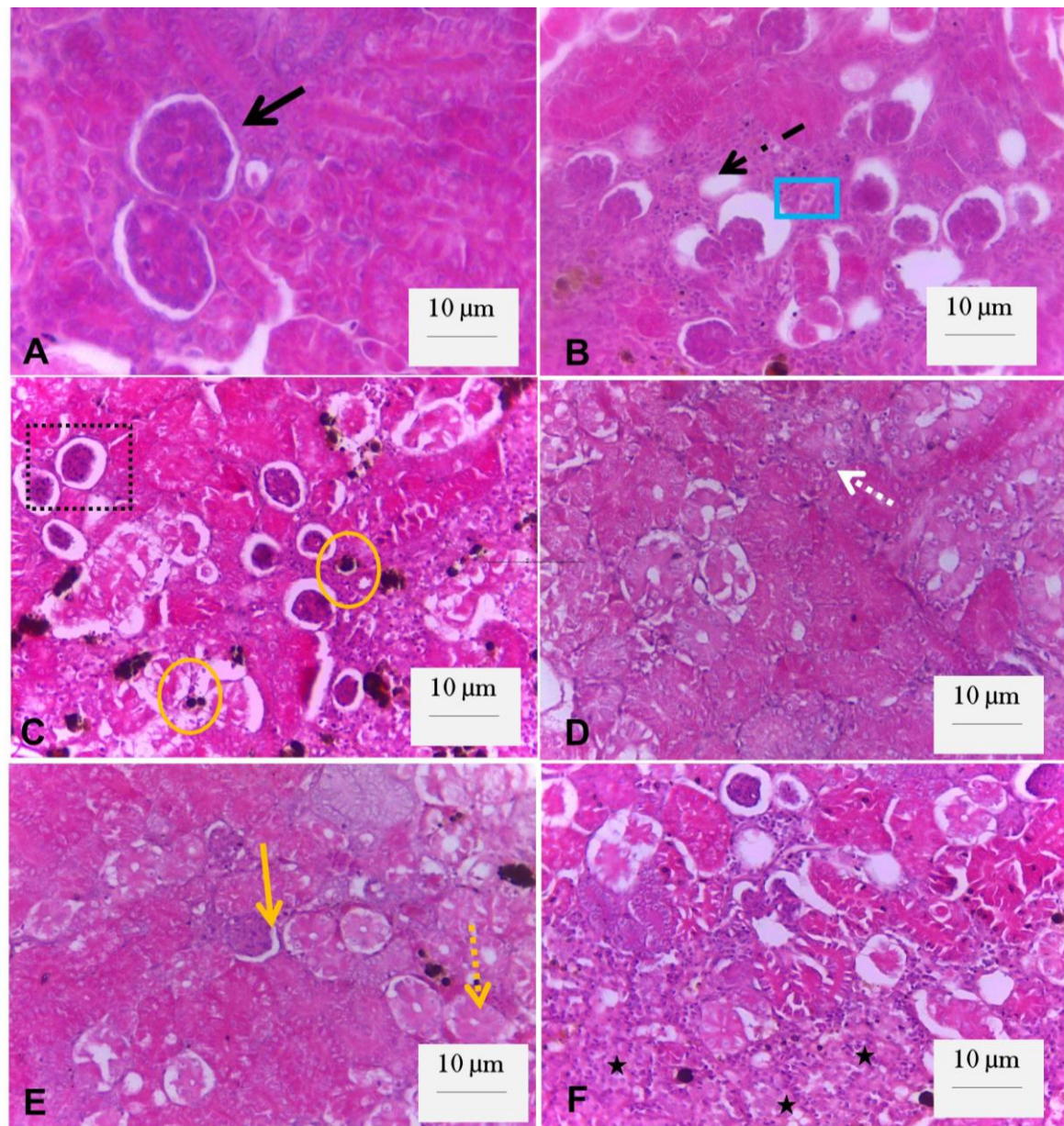
Estágio	Alterações	Controle	Água 24 h	Água 48 h	Ração 24 h	Ração 48 h
I	Atrofia do glomérulo	0	0	0+	+	++
	Degeneração hialina	0	0	0	0	+
	Dilatação dos capilares dos glomérulos	0+	+	+	0+	+
	Estreitamento da luz tubular	0+	+	+	0+	+
	Hipertrofia celular	0+	+	+	0+	+
	Hipertrofia nuclear	0+	+	+	+	+
	Melanomacrófagos	+	++	++	+	+++
II	Vacuolização celular	0	0+	+	+	+
	Degeneração tubular	0	0	+	+	+
	Oclusão da luz tubular	0+	+	++	+	++
II	Redução do espaço do Bowman	0	0+	0+	0+	+
III	Necrose	0	0+	0+	0	+

0 = sem alteração; 0+ = alterações raramente frequentes; + = alterações frequentes; ++ = alterações muito frequentes; +++ = alterações extremamente frequentes.



**Figura 5.** Índice de alteração histopatológica (IAH) e valor médio de alteração (VMA) no rim de *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Valores expressam média e desvio padrão da média. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), e acordo ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett.

As principais alterações histopatológicas renais encontradas em *A. gigas* expostos ao biopesticida a base de *B. thuringiensis*, através da água dos tanques de cultivo e alimentação com ração contendo biopesticida, após 24 e 48 horas, são mostradas na Figura 6A-F.



**Figura 6.** Alterações histopatológicas no rim de *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. (A) Peixes controle: tecido renal sem alterações histopatológicas, glomérulos (seta preta). (B) Peixes expostos ao biopesticida na água, após 24 horas, hipertrofia nuclear (quadrado azul) e dilatação dos capilares (seta preta tracejada). (C) Peixes expostos ao biopesticida na água, após 48 horas, áreas com presença de Centros de Melanomacrófagos (círculos amarelos); Glomérulo normal (quadrado preto tracejado). (D) Peixes expostos ao biopesticida na água, após 24 horas, hipertrofia nuclear (Seta branca tracejada). (E) Peixes expostos ao biopesticida na água, após 48 horas, oclusão da luz tubular (seta amarela tracejada) e estreitamento da luz tubular (seta amarela). (F) Peixes alimentados com dieta contendo biopesticida na água, após 24 horas, necrose focal (asteriscos). Coloração: Hematoxilina e Eosina.

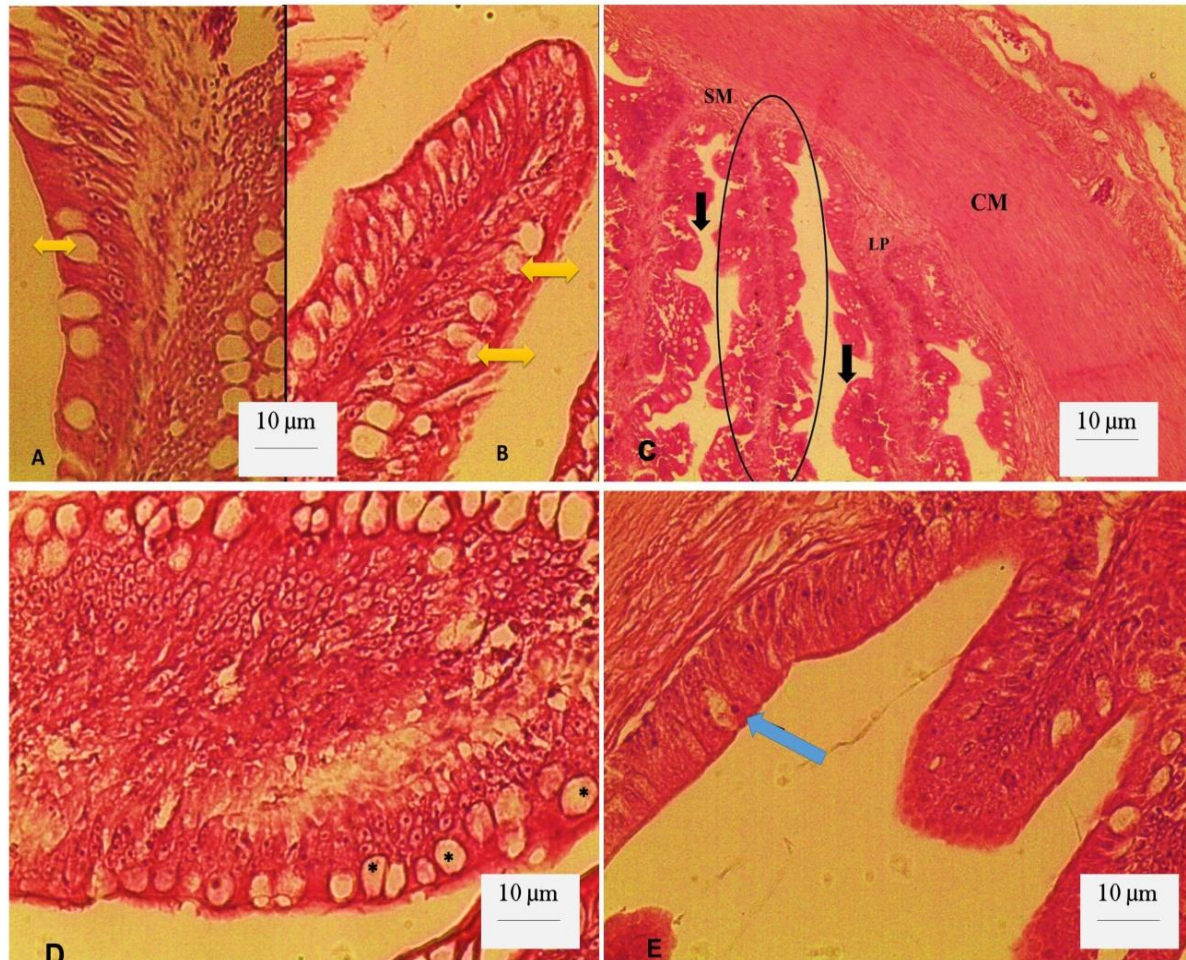
Em *Arapaima gigas* expostos a biopesticida a base de *B. thuringiensis* foram analisadas o número total de vilosidades verticais e horizontais, número de células caliciformes em cinco vilosidades verticais e número de linfócitos em dez vilosidades horizontais. O número de vilosidades verticais reduziu ( $p < 0,05$ ) nos peixes expostos a água contendo biopesticida após 48 horas e aumentou ( $p < 0,05$ ) nos peixes que receberam dieta com biopesticida após 24 horas, quando comparados aos controles. O número de vilosidades horizontais aumentou ( $p < 0,01$ ) nos peixes que receberam dieta com biopesticida, após 24 e 48 horas. O número de células caliciformes diminuiu ( $p < 0,05$ ) nos peixes exposto a água contendo biopesticida e nos peixes que receberam dieta com biopesticida, após 48 horas. O número de linfócitos no rim dos peixes exposto a água contendo biopesticida após 24 horas mostrou redução ( $p < 0,01$ ), quando comparados aos controles.

**Tabela 7.** Estruturas intestinais em *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

<b>Ensaio na água</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controles</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Vilosidades verticais	22,6±2,5 <sup>a</sup>	19,2±1,5 <sup>a</sup>	15,0±1,1 <sup>b</sup>
Vilosidades horizontais	40,2±7,8 <sup>a</sup>	40,6±5,7 <sup>a</sup>	57,7±3,9 <sup>a</sup>
Células caliciformes	293,4±43,0 <sup>a</sup>	264,4±42,1 <sup>a</sup>	173,6±6,8 <sup>b</sup>
Linfócitos	10,7±1,1 <sup>a</sup>	6,0±0,5 <sup>b</sup>	9,6±0,7 <sup>a</sup>
<b>Ensaio na ração</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controles</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Vilosidades verticais	22,6±2,5 <sup>a</sup>	29,6±2,6 <sup>b</sup>	20,5±1,1 <sup>a</sup>
Vilosidades horizontais	40,2±7,8 <sup>a</sup>	151,4±14,3 <sup>b</sup>	165,3±19,5 <sup>b</sup>
Células caliciformes	293,4±43,0 <sup>a</sup>	217,5±31,4 <sup>a</sup>	129,8±7,4 <sup>b</sup>
Linfócitos	10,7±1,1 <sup>a</sup>	9,0±0,6 <sup>a</sup>	8,7±0,7 <sup>a</sup>

Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os controles, de acordo com ANOVA, seguido do pós-teste de Dunnett.

As principais alterações histopatológicas encontradas no intestino de *A. gigas* expostos a água e ração com biopesticida a base de *B. thuringiensis*, após 24 e 48 horas, são mostradas na Figura 7A-E.



**Figura 7.** Alterações histopatológicas no intestino de *Arapaima gigas* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. A – Grupo controle: Epitélio Intestinal, Seta amarela indica espessura da mucosa intestinal (vvilosidades verticais). B) Grupo Água 48 horas: Vilosidades verticais – Setas amarelas indicam as alterações na espessura da mucosa intestinal. C) Intestino de peixes que receberam dieta contendo biopesticida, após 48 mostrando camada muscular (CM), submucosa (SB), lâmina própria (LP), vilosidades horizontais (seta pretas) e vilosidades verticais (círculo). D) Grupo Ração 48 horas: Células do epitélio intestinal, mostrando a presença de células caliciformes (asterisco). E) Grupo Água 24 horas: epitélio intestinal mostrando a presença de linfócito (seta azul). Coloração: Hematoxilina e Eosina.

## DISCUSSÃO

Em *A. gigas* expostos a água e dieta contendo biopesticida à base de *B. thuringiensis* não houve mortalidade durante e após 24 horas dos ensaios, mas a mortalidade iniciou-se com 48 horas após os ensaios, chegando a 100% em 168 horas.

Estudos sobre a ação de *B. thuringiensis* em trutas relataram mortalidade de 20% dos peixes ao final do experimento de 32 dias. Tais resultados foram atribuídos à excessiva competição por alimentos entre os peixes e pela água turva devido à presença das altas concentrações do microrganismo (OLIVEIRA-FILHO, 2008; RAMOS, 2008). No presente estudo, a concentração de *B. thuringiensis* na água e na ração também causou turbidez na água, principalmente quando o biopesticida foi introduzido diretamente nos tanques. Porém, não foi observado em nenhum dos grupos experimentais competição por alimento, fato que não permite atribuir a mortalidade dos peixes a esse tipo de competição. Além disso, a variedade da bactéria (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) utilizada neste experimento difere daquela utilizada nos estudos de Oliveira-Filho (2008) e Ramos (2008), que fizeram uso de *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Portanto, outros fatores foram responsáveis por essa mortalidade em *A. gigas* expostos a água e dieta contendo biopesticida à base de *B. thuringiensis*.

Estudos realizados por Jonsson *et al.* (2009), sobre os efeitos de *B. thuringiensis*, (dois ativos e uma inativo) em *Hyphessobrycon scholzei* mostraram que nenhum peixe morreu até o sétimo dia da exposição. Porém, a partir da segunda semana a taxa de mortalidade nas concentrações de *B. thuringiensis* ativos atingiu 2% e ao final do experimento essa taxa passou para 9%, enquanto o grupo contendo *B. thuringiensis* inativo não apresentou nenhuma morte de peixes. Previamente às mortes, os peixes também apresentaram natação errática e descoordenada, com aumento da frequência dos movimentos operculares. Copatti *et al.* (2009) relataram que o contato de inseticidas organoclorados com espécies não-alvo, como peixes, tem como consequência o acúmulo de pesticida em diferentes tecidos, podendo produzir distúrbios no metabolismo dos animais. Porém, os biopesticidas tem sua base em microrganismos, mas seus efeitos são ainda pouco conhecidos em peixes. Todavia, Chen *et al.* (2014) relataram que tartarugas aquáticas *Trionyx sinensis* apresentaram problemas de locomoção, trato respiratório e intestinal, além de mortalidade causada pela presença de *B. thuringiensis*, mostrando então, pela primeira vez, o potencial patogênico dessa bactéria a espécies não-alvo.

Em peixes, parâmetros hematológicas e bioquímicas possibilitam uma rápida detecção das características fisiológicas e patológicas, indicando possíveis distúrbios metabólicos ocorridos (DRUMOND *et al.*, 2010; MARIANO *et al.*, 2009; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Alterações sanguíneas podem ser características das respostas secundárias dos peixes a agentes estressores (WENDEELAR BONGA, 1997) e tóxicos. A redução do hematócrito em *A. gigas* em expostos a *B. thuringiensis* sugere que esse

biopesticida atua como um agente estressor agudo. Alterações no tamanho e quantidade de eritrócitos, indicadas pelo VCM, também podem ter influências na redução do hematócrito dos peixes alimentados com ração contendo *B. thuringiensis*. Assim, o hematócrito foi um bom indicador dos efeitos ambientais adversos nesses peixes (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Porém, em *Colossoma macropomum* expostos também este mesmo biopesticida a base de *B. thuringiensis*, na concentração 20 mg/L, não houve alteração no hematócrito e hemoglobina, enquanto o número de eritrócitos diminuiu nos peixes alimentados com dieta contendo esses biopesticida (MARIANO et al., 2017).

Os trombócitos de peixes são células multifuncionais, uma vez que participam primariamente no processo de coagulação e, secundariamente, no mecanismo de defesa (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; TAVARES-DIAS et al., 2007; NAGASAWA et al., 2015); de forma que estão em constante movimentação entre os órgãos hematopoiéticos e a circulação. Em peixes, está demonstrado que os trombócitos podem realizar fagocitose quando estimulados por fatores relacionados aos leucócitos (NAGASAWA et al., 2015). Em *A. gigas* mantidos em água contendo biopesticida a base *B. thuringiensis*, o número de trombócitos aumentou após 24 horas e reduziu após 48 horas. Portanto, tais flutuações no número de trombócitos podem ser esperadas, devido as suas múltiplas funções no organismo.

Nos peixes, a exemplo de outros vertebrados, os leucócitos são os componentes celulares da primeira linha de defesa imunológica. Assim, um dos meios de se estudar a resposta do sistema de defesa é analisar do número de leucócitos em diversas situações ambientais (TIERNEY et al., 2004; RANZANI-PAIVA et al., 2013), incluindo a exposição a biopesticidas. Houve uma redução no número de leucócitos totais após 48 horas da exposição de *A. gigas* água contendo biopesticida a base *B. thuringiensis*, enquanto nos peixes que receberam dieta contendo biopesticida houve aumento após 24 e 48 horas. Tais variações no número de leucócitos ocorreram em resposta a variação no número de linfócitos, neutrófilos, monócitos e LG-PAS. Os linfócitos são leucócitos envolvidos em uma variedade de funções imunológicas, tais como a produção de imunoglobulinas e modulação da defesa. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos fagocíticos em resposta às infecções. Os monócitos e LG-PAS são fagócitos que realizam migração para o foco inflamatório durante processos infecciosos (SANTOS e TAVARES-DIAS, 2010; RANZANI-PAIVA et al., 2013). Assim, variações no número dessas células de defesa é esperado, devido ao tráfego delas imunológicas entre os vasos



sanguíneos e os órgãos do sistema imune de maturação e apresentação de antígenos (TAVARES-DIAS e MORAES 2004).

Em biopesticidas a base de *B. thuringiensis*, a ação dessa bactéria em insetos ocorre devido a lesões no trato gastrointestinal desses invertebrados alvos, ocasionando problemas de absorção de nutrientes, que levam esses animais a morte por inanição (MARTINS et al., 2010; CHEN et al., 2014; PORTUGAL et al., 2017). Em *A. gigas*, os níveis plasmáticos de proteínas totais, colesterol e triglicerídeos demonstram variação causada por aumento ou redução desses mediadores nutricionais, pois os peixes expostos ao biopesticida na água passaram por ajustes nas primeiras 24 horas de exposição, mas recuperaram-se em 48 horas. Porém, os peixes que receberam o biopesticida via dieta apresentaram alterações em 24 e 48 h de exposição, levando mais tempo para a ocorrência de ajustes, possivelmente devido a uma modificação nas características da ração, causando redução na ingestão. De acordo com Oba et al. (2009) os mediadores de estresse (corticoides e catecolaminas) podem alterar os níveis proteicos e de ácidos graxos.

Estudos verificaram que o cortisol plasmático influencia, dentre outras ações, na distribuição de leucócitos em compartimentos corporais de peixes, indicando alterações em número e padrão de distribuição em situações de estresse agudo (WEENDELAAR-BONGA, 1997; URBINATI, et al., 2015). Os níveis de cortisol em *A. gigas* submetidos ao biopesticida não alteraram na maioria dos grupos, mas não é possível afirmar que não houve situação de estresse desencadeada analisando apenas as informações apresentadas pelo cortisol, pois existe a ação das catecolaminas (que não foram dosadas e quantificadas no presente estudo) que é sugerida pela literatura como atuante tanto nas situações de estresse agudo e em alguns casos no estresse crônico (BARTON, 1997; WEENDELAAR-BONGA, 1997; URBINATI, et al., 2014; URBINATI, et al., 2015). Urbinati et al. (2015) relataram que concentrações de catecolaminas são raramente analisadas, pois o aumento durante o estresse é muito rápido e sua meia vida é muito curta.

O metabolismo anaeróbico parece não ter sido a via principal de recrutamento energético em *A. gigas* submetidos a biopesticida à base *B. thuringiensis*, uma vez que não houve alterações nos níveis plasmáticos de lactato. Nos peixes expostos a água contendo biopesticida ou alimentados com dieta contendo biopesticida, as flutuações nos níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  parecem estar relacionadas às respostas secundárias ao estresse, embora não tenha ocorrido alterações significativas nos níveis de cortisol e glicose. Wendelaar-Bonga (1997) cita que as células cloreto possuem trocadores ( $\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ ) iônicos que são ativados em situações de estresse, além da perda

iônica por processos de difusão simples ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ ) estimulados por cortisol e adrenalina. Os desequilíbrios iônicos mais acentuados ocorreram entre os íons sódio e cloreto, que oscilaram entre perdas e ganhos no plasma de *A. gigas* deste estudo. Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  podem ter sido usados como trocadores celulares ou podem ter sido veiculados, entre o sangue e compartimento celulares, por transportes simples de difusão, para restabelecer ajustes iônicos ideais para essa situação ambiental. Todavia, os peixes respondem aos agentes estressores de forma a refletir a severidade e duração do estressor usado (BARTON, 1997; MARIANO, et al., 2009; URBINATI, et al., 2015).

Em peixes expostos ao pesticida atrazina foi relatado desequilíbrio iônico, devido à redução plasmática dos níveis de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (MORON et al., 2006), similar ao que ocorreu no presente estudo. MacDonald e Milligan (1997) relataram que em peixes de água doce, a disfunção iônica pode ocorrer pela perfusão das lamelas secundárias das brânquias. As brânquias de *A. gigas* vão perdendo a função respiratória à medida que estes peixes crescem, mas ainda atuam nos processos osmorregulatórios (RAMOS, 2008).

Os níveis da atividade das enzimas ALT e AST servem como bioindicadores de lesões teciduais de qualquer natureza afetando o parênquima hepático dos animais, o que reflete na elevação de seus níveis plasmáticos ou séricos (SPARLING et al., 1998, AMACHER, 2002; MOSER, 2005). A ALT ocorre predominantemente no fígado, mas está presente em concentrações menores nos rins, coração e músculos. A AST possui altas concentrações no coração, fígado e músculos esqueléticos, e em menor quantidade nos rins e pâncreas. Portanto, quando há presença de lesões nesses órgãos, em geral, há liberação de uma maior quantidade dessas enzimas na corrente sanguínea (ALVES, 2003; PAULINO, 2015). Em *A. gigas* expostos a água com biopesticida e nos alimentados com biopesticida, após 48 horas houve aumento nos níveis de AST e redução nos níveis de ALT nos peixes alimentados com biopesticida, quando comparado aos peixes não expostos ao biopesticidas a base de *B. thuringiensis*.

A bactéria *B. thuringiensis* parece não ter causado lesões tissulares graves em *A. gigas*, pois a literatura (OZER et al., 2008; SARACENI, 2001, PAULINO, 2015) diz que essas lesões podem ser compreendidas analisando o aumento da concentração sérica da enzima ALT e confirmando com outros biomarcadores como, por exemplo, a AST, porém a atividade da enzima ALT não apresentou aumento significativo em nenhum grupo. PAULINO (2015) comenta que ALT é o melhor biomarcador para hepatotoxicidade, exibindo baixa frequência de resultados falso-positivos para dano hepático.

Os poluentes ambientais, sejam químicos ou biológicos, podem causar lesões estruturais nos peixes expostos. Análises histopatológicas são consideradas ferramentas sensíveis para detectar a presença e efeitos desses poluentes em órgãos-alvos dos peixes (SILVA, 2004). Em *A. gigas* expostos a biopesticidas a base de *B. thuringiensis* na água dos tanques e naqueles alimentados com ração contendo biopesticida ocorreram lesões hepáticas e renais variando de leve a severa, indicando os efeitos nocivos do biopesticida usado. Porém, não foi possível discriminar qual o mecanismo que levou a essas lesões, ou seja, se foi mediado pelas toxinas Cry ou pelos esporos da bactéria, pois *B. thuringiensis* produz e secreta dezenas de substâncias químicas, dentre essas as proteínas Cry que são usadas como entomotoxinas (PRAÇA et al., 2007). O fígado é um órgão que desempenha inúmeras funções vitais no metabolismo tais como metabolização de compostos endógenos (proteínas), carboidratos e lipídios, além de atuar na hematopoese e exercer papel fundamental na síntese e oxidação de ácidos graxos. As células hepáticas também armazenam glicogênio e sintetizam proteínas plasmáticas (EVANS, 1993; HILTON et al., 1992, SILVA, 2004). Porém, o rim nos peixes recebe grande fluxo sanguíneo, provenientes das brânquias, conseqüentemente é um órgão alvo de contaminação aquática (SILVA, 2004).

Um dos problemas gerados pela exposição a produtos tóxicos é a estagnação biliar, que consiste na permanência de bile na forma de grânulos castanhos-amarelados no citoplasma dos hepatócitos (RIBEIRO, 2014), uma alternativa metabólica, em que a condição patofisiológica é atribuída a falhas no metabolismo de excreção dos pigmentos biliares (FANTA, et al., 2003). A estagnação biliar observada em *A. gigas* deste estudo é mais um indicativo de que os peixes tiveram acesso a produtos metabólicos do *B. thuringiensis*, os quais atuaram como agentes tóxicos para esses animais.

As principais alterações histopatológicas renais encontradas em *A. gigas*, expostos a biopesticida a base de *B. thuringiensis*, foram hipertrofia nuclear, redução do espaço da cápsula de Bowman, oclusões e estreitamento da luz tubular e necrose. Tais alterações degenerativas no rim podem ser devido à presença de produtos tóxicos no filtrado glomerular (RANDING, 1995; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; SILVA, 2004). Alterações histopatológicas similares foram descritas no rim de *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais do pesticida triclorfon (VEIGA et al., 2002). Nos rim dos peixes desse estudo foi também observada grande presença de centros de melanomacrófagos, que são responsáveis pela remoção de partículas estranhas ou produtos da degradação celular por fagocitose (WOLKE et al., 1995). A presença

melanomacrófagos nos rins podem estar associados a lesões inflamatórias (AGIUS e ROBERTS, 2003) e, portanto, tais pigmentos podem ser considerados indicadores de estresse devido à presença de agentes químicos (ANDERSON e ZEEMAN, 1995).

As vilosidades intestinais são estruturas permanentes que aumentam a área superficial desse órgão de absorção de nutrientes (GARTNER e HIATT, 2003). Em *A. gigas* deste estudo, o número de vilosidades intestinais verticais aumentou nos peixes alimentados com dietas a base de *B. thuringiensis* após 24 horas, mas reduziu após 48 horas. O número de vilosidades horizontais do intestino, por sua vez, aumentou nos peixes alimentados com dietas a base de biopesticida após 24 e 48 horas, devido ao aumento da camada mucosa sobre as células endoteliais e caliciformes. A presença de uma camada mucosa mais espessa dificulta a absorção de nutrientes pelas células endoteliais, tornando necessário o aumento da superfície de absorção, uma vez que está sendo prejudicada pela intensa ação das células caliciformes. De acordo com os estudos de Pelicano et al. (2003), distúrbios na microbiota intestinal, causados por patógenos, estresse ou substâncias químicas, podem reduzir o número de vilosidades, e conseqüentemente, diminuir a atividade digestiva e absorptiva nos animais.

Em peixes, a presença de células caliciformes no intestino está relacionada a diferentes condições de alimentação e proteção contra atividades bacterianas; proteção do epitélio (fluxo laminar) contra alimentos provenientes do estômago, rico em enzimas digestivas com pH acentuadamente ácido (HONORATO et al., 2011). Em *A. gigas*, a exposição a biopesticida à base de *B. thuringiensis* parece ter promovido ajustes no intestino, caracterizados pela diminuição de células caliciformes. Porém, aumento das células caliciformes está relacionada com a boa qualidade da microbiota intestinal e aumento a produção de muco que ocorre após agressão por agentes patogênicos, tendo um papel importante na proteção contra infecções (MELO et al., 2013). Além disso, entre os enterócitos de *A. gigas*, deste estudo, foi observada também foi a presença de linfócitos, indicando uma barreira celular de defesa imunológica. Linfócitos intra-epiteliais (células T citotóxicas) podem estar envolvidas na tolerância imunológica oral e também na resposta imune das mucosas intestinais em peixes (ETO et al., 2013). Linfócitos B aparecem tardiamente na mucosa intestinal, enquanto o aparecimento precoce de linfócitos T nesse órgão sugere que esse pode ser um local de diferenciação extra-tímico desses leucócitos (CAIN et al., 2000; ROMBOUT et al., 2010).

## CONCLUSÕES

Este primeiro estudo sobre impactos de biopesticida a base *B. thuringiensis* mostrou que esse causou mortalidade devido a alterações sanguíneas e estruturais no fígado e rim de *A. gigas*. Assim, outros estudos com biopesticida a base de *B. thuringiensis* podem ajudar a elucidar os mecanismos de ação desta bactéria em organismos não-alvos como peixes. Além disso, conhecer se biopesticidas atuam direta e indiretamente causando estresse nos peixes expostos é fundamental para a aquicultura. Análises histopatológicas comprovaram ser consideradas ferramentas úteis na detecção dos efeitos de poluentes na estrutura de peixes. Portanto, biopesticida a base *B. thuringiensis* mostrou ser prejudicial à saúde dos peixes nas concentrações e meios utilizados, assim deve ser usado com cuidado.

## REFERÊNCIAS

- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. **Jornal os Fish Diseases**, 26:499-509, 2003.
- ALVES, S.P.C. Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville (SC). **Dissertação de Mestrado**. UFSC, 60p. 2003.
- AMACHER, D.E. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. **Hum. Exp. Toxicol**, 21:253–262, 2002.
- ANDERSON, D. P.; ZEEMAN, M. G. Immunotoxicology in Fish. In: RAND, G. M. (Editor). **Fundamentals of Aquatic Toxicology Effects: environmental fate and risk assessment**. 2. ed.: Taylor & Francis, 1:345-369, 1995.
- BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge University Press, 62:1-33, 1997.
- BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, 34(1):843-850, 2003.
- CAIN, K. D.; JONES, D. R.; RAISON, R. L. Characterization of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. **Fish Shelfish Immunol**, 10(8):651-666, 2000.
- CHAPADENSE, P. F. G.; CASTRO, F.J.; ALMEIDA, J.A.; MORON, S.E. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, 10(2):398-405. 2009.

CHEN J., ZHU N., KONG L., BEI Y., ZHENG T., DING X., HE Z. First case of soft shell disease in Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinens*) associated with *Aeromonas sobria*—*A. veronii* complex. **Aquaculture**. 406:62–67, 2013.

COPATTI, C. E.; GARCIA, L. O.; BALDISSEROTTO, B. Uma Importante Revisão Sobre o Impacto de Agroquímicos da Cultura de Arroz em Peixes. **Biota Neotrop.** 9(4): 235-242, 2009.

DRUMOND, G. V. F.; CAIXEIRO, A. P. A.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E.G Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. **Acta Amazonica**, 40(3):591-595, 2010.

ETO, S.F.; CLAUDIANO, G.S.; FERNANDES, D.C.; MARCUSSO, P.F.; SILVA, V.O.; SACCOM, T.F.M.; SALVADOR, R. Biologia do Sistema Imune dos Teleósteos. **Revista Científica da Faculdade Dom Bosco**, 1:28-38, 2013.

EVANS, D.H. Osmotic and ionic regulation. In: EVANS, D.H. (eds.) **The physiology of fishes**. CRC, Press, Boca Raton, 1993.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 54:119-130, 2003.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em Cores**. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A. & OKIHIRO, M.S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopatological markers of antropogenic stress**. Lewis Publishers, 1(4):155-208, 1992.

HONORATO, C. A.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D. J.; MACHADO, M. R. F. Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo silagem de peixe. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science Impact Factor**. 48(4):281-288, 2011.

JONSSON, M.; FICK, J; KLAMINDER, J.; BRODIN, T., Antihistamines and aquatic insects: Bioconcentration and impacts on behavior in *Damselfly larvae* (Zygoptera). **Science of the Total Environment**, 472:108–111, 2014.

MARIANO, W. S.; MORON, S. E.; GARCIA, R.G.; TAVARES-DIAS. Impactos de pesticidas e biopesticidas na aquicultura. In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W. S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Pedro & João Ed., São Carlos (SP), 2:621-638, 2015.

MARIANO, W.S., OBA, E.T., SANTOS L.R.B.; FERNANDES, W.S. Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) expostos ao ar atmosférico. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, 10(1):210-223, 2009.

MARIANO, W.S.; SOUSA, F.L.G.; TAVARES-DIAS, M.; RODRIGUES, R.C.; AZEVEDO, S.B.; LIMA, J.O. Estudo hematológico de tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetido à concentração subletal de biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Sodebras**, 12(135):161-167, 2017.

MARTINS, E. S.; MONNETAT, R.G.; QUEIROZ,P.R; DUMAS, V.F.; BRAZ, S.V; SOUZA-AQUIAR, R.W.; GOMES, A.C.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A.; RIBEIRO, B.M. Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 40:138-145, 2010.

MCDONALD, G.; MILLIGAN, C.L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G.W.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press,1:119-144, 1997.

MELO, H; MORAES, J. R. E.; NIZA, I. G.; MORAES, F. R.; OZÓRIO, R. O. A.; MARINA, T. S.; SHIMADA, M. T. ENGRACIA-FILHO, J. R.; CLAUDIANO, G. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesq. Vet. Bras.** 33(6):724-730, 2013

MORON, S.E.; POLEZ, V. L. P.; ARTONI, R.A.; RIBAS, J. L. C; TAKAHASHI, H.K Estudos de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* expostos ao herbicida Atrazina. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** 1(1):1-4, 2006.

NAGASAWA, T; I SOMAMOTO, T.; NAKAO, M. Carp thrombocyte phagocytosis requires activation factors secreted from other leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, 52:107–11, 2015.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e Sanidade de peixes em cultivo**, 1:226-246, 2009.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** 3:1-7, 2008.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; RAMOS, F.R.; MUNIZ, D.H.F.; LOPES, M.C.; OLIVEIRA, R. S.; ALVES. R. T.; GRISOLIA, C. K.; MONNERAT, R.G. **Avaliação dos efeitos adversos de entomopatógenos sobre peixes e camundongos**. Planaltina (DF): Embrapa Cerrados. 20p. 2009.

PAULINO, M.G. Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fenandoi* no teleosteo, *Hoplia malabaricus*. **Tese de doutorado**, UFSCAR, São Carlos, 141p. 2015.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA,P.A.; SOUZA,H.B.A; OBAB, A.; NORKUSC, E.A; KODAWARAC, L.M. LIMAD, T.M.A Morfometria e Ultra-Estrutura da Mucosa Intestinal de Frangos de Corte alimentados com Dietas contendo diferentes Probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, 98(547):125-134, 2003.

POLANCZYK, R. A. Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Tese de doutorado** – USP. Piracicaba, 108p. 2004.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. (Ed.). **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: FISHING NEWS BOOKS, 1:339-352, 1994.

PORTUGAL, L.; MUNOZ-GARAY, C.; MARTINEZ DE CASTRO, D. L.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Toxicity of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* to CF1 cells does not involve activation of adenylate cyclase/PKA signaling pathway. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 80:21-31, 2017.

PRAÇA, L. B.; CONCEIÇÃO, R. da; SANTOS, W. J.; MONNERAT, R. G. *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae): Aspectos gerais, modo de ação e utilização. Brasília-DF: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 40p. 2007.

RADING, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate risk assessment**. Washington, Tayloy e Francis, 2<sup>ed</sup>. 1995.

RAMOS, C.A. Caracterização morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas*, durante a transição da respiração aquática para respiração aérea. **Dissertação de Mestrado**, São Carlos-SP 78p. 2009.

RAMOS, F. R. Avaliação a campo de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* tóxica á Lepidoptera e seu possível efeito adverso sobre espécies não-alvo. **Dissertação de mestrado** – UNB, Brasília, 132p. 2008.

RANZANI-PAIVA, M. J.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para Análise Hematológica em Peixes**. Eduem ed. Maringá (PR). 2013.

RIBEIRO, M.C. Tolerância de Lambaris (*Bryconops caudomaculatus*) submetidos a diferentes concentrações de amônia. **Dissertação de Mestrado**, UFMA, Chapadinha-MA 68p. 2014.

ROMBOUT, J. H.;VAN DE WAL, J.W.; COMPANJEN, A.; TAVERNE, N. TAVERNE-THIELE,J.J. Characterization of T cell lineage marker in carp, *Cyprinus carpio*. **Developmental and Comparative Immunology**, 21(1):35-46, 2010.

SANTOS, R. B. S.; TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (pisces, doradidae) oriundos da bacia do médio rio solimões, **Boletim do Instituto de Pesca**. 36:283-292, 2010.

SCHELENK, D. Pesticide biotransformation in fish. **Biochemitry and molecular biology of fishes**, 6:171-190, 2015.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W. TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-



related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6:75-86, 1997.

SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores de contaminação aquática**. Dissertação de Mestrado. Londrina- PR. 75p. 2004.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **Atlas of fish histology normal and pathological features**. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Villimpres Complexo Gráfico, Ribeirão Preto (SP). 144 p. 2004.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish A cytochemical study and ultrastructural analysis. **J. Appl. Ichthyol**, 23:709-712, 2007.

TIERNEY, K.; FARREL, A.P.; KENNEDY, C. J. The differential leukocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culea inconstans* and *Pimephales promelas*. **J. Fish Biol.**, 65:906-919, 2004.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F. S.; BILLER-TAKAHASHI, J. D. Estresse e Sistema Imune em Peixes. In BALDISSEROTTO, CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E. C. **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. Unesp, 336p. 2014.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F. S.; SERRA, M.; WOLKERS, C. P. B.; SABIONI, R.E. Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas. . In:

TAVARES-DIAS, M; MARIANO, W. S. (Org). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Editora Pedro & João, São Carlos (SP), 1(1): 381-410, 2015.

WENDELAAR BONGA, S. E. **The Stress Response in Fish**. Taylor & Francis ed. London, 1997.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S.; OBEREMM, A.; MEEMS, N.; BEATTIE, K.A.; STEINBERG, C.E.W.; CODD, G.A. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). **Environ. Toxicol.**, 14:89-95, 1999.

WOLKE, R. E.; MURCHELANO. R. A.; DICKSTEIN, C. D., GEORGE, C. J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates as fish health monitors. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 35:222-227, 1985.

## ARTIGO 2

**Parâmetros fisiológicos de *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis***

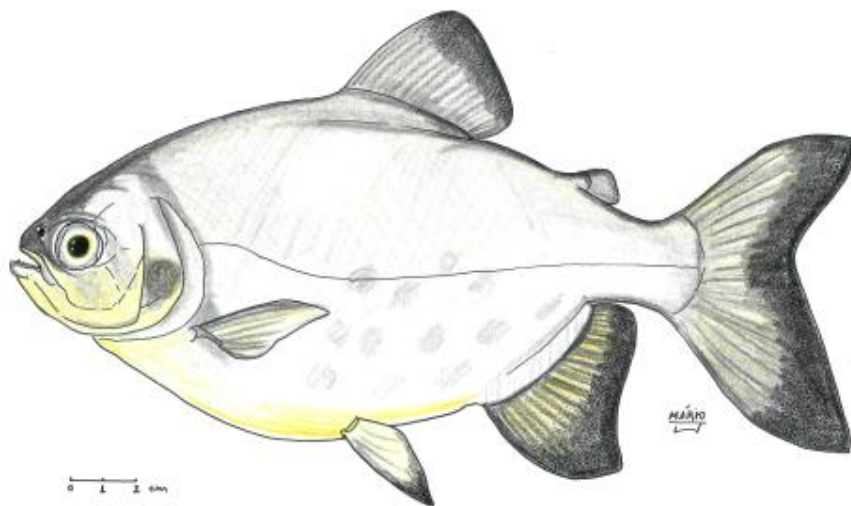


Ilustração: Mário Júnior Saviato

**Parâmetros fisiológicos de *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae)  
expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis***

Wagner dos Santos Mariano<sup>1, 3\*</sup>; Saulo Borges de Azevedo<sup>2</sup>; Francisco Luis Gomes<sup>3</sup>;  
Marcos Tavares-Dias<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-BIONORTE), Macapá, AP, Brasil.

<sup>2</sup> Museu Paraense Emílio Goeldi – Belém- PA

<sup>3</sup> Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína. Araguaína, TO, Brasil.

<sup>4</sup> Embrapa Amapá, Macapá, AP, Brasil.

\*Autor correspondente: Wagner dos Santos Mariano.

Email: [wagnermariano@uft.edu.br](mailto:wagnermariano@uft.edu.br)

## RESUMO

Uma das formas de controles biológico (biopesticidas) utilizados na agricultura é a bactéria *Bacillus thuringiensis* que combate pragas, principalmente em lavouras de soja, milho e algodão. Em geral, os biopesticidas a base de *B. thuringiensis* são considerados seguros para a saúde de organismos não-alvos. Assim, este estudo investigou os efeitos fisiológicos da introdução de biopesticida a base de *B. thuringiensis* na água e dieta de *Piaractus mesopotamicus*, após 24 e 48 horas. Foi adicionado 0,13 g de biopesticida por kg de ração comercial contendo biopesticida. Para os peixes submetidos ao biopesticida diretamente na água dos tanques foi adicionado 20 mg/L do produto. Foram analisados o eritrograma (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos), trombograma, leucograma, perfil bioquímico plasmático (sódio, cloreto, potássio, colesterol, glicose, triglicerídeos, cortisol proteínas totais) e enzimático (Aspartato Amino Transferase e Alanina Amino Transferase). Houve mortalidade dos peixes após 48 horas da exposição a água e dieta contendo biopesticida e ajustes fisiológicos, causados por aumento ou redução de parâmetros fisiológico dos peixes, após 24 e 48 horas. Embora as concentrações do biopesticida levaram a alterações sanguíneas, não afetaram a homeostasia dos peixes, mas concentrações mais elevadas podem ser mais nocivas à saúde dos animais, devido ao estreito contato desses com o ambiente aquático.

**Palavras-Chave:** Bioquímica, Pacu, Piscicultura, Hematologia.

## INTRODUÇÃO

Os processos agrícolas no mundo contemporâneo utilizam elevados níveis de agrotóxicos, e essa prática cresce proporcionalmente ao aumento da produção. Esse uso de agrotóxicos é para atender a crescente demanda de produção de alimentos para o homem. Dentre as estratégias mais utilizadas no combate de pragas os inseticidas sintéticos controlam insetos nocivos ou não à agricultura (GUSMÃO, 2013).

Os biopesticidas vêm sendo utilizados como alternativa aos pesticidas químicos e são considerados vantajosos por serem menos tóxicos e causarem danos somente ao inseto-alvo. Além disso, os biopesticidas são utilizados em pequenas concentrações e possuem decomposição rápida (ANGELO et al., 2010). Os biopesticidas a base de bactérias, são geralmente utilizados no controle de invertebrados, principalmente de insetos que invadem as diversas culturas tais como soja, milho e algodão. Porém, são pouco conhecidos estudos sobre os efeitos de biopesticidas a base de bactérias em espécies não-alvos tais como aves, mamíferos e peixes. Assim, não se conhece a toxicidade desses produtos agrícolas usados nas práticas de produção.

Biopesticidas a base de bactérias usados na agricultura podem atingir corpos d'água naturais e artificiais e essas bactérias pode juntar-se as bactérias residentes. Existem bactérias que fazem parte da microbiota aquática e são consideradas patogênicas oportunistas para peixes, por exemplo, visto que somente manifestam-se provocando infecções quando os peixes encontram-se em condições ambientais desfavoráveis. Para o cultivo, além de perdas econômicas devido a mortalidade de peixes, as bactérias podem causar, geralmente, lesões cutâneas, redução no crescimento e ganho de peso, impedindo o consumo (BOIJINK e BRANDÃO, 2001) e inviabilizando a comercialização da produção.

Atualmente, biopesticidas a base de *Bacillus thuringiensis* tem sido amplamente utilizados na agricultura de vários países. Esses biopesticidas têm sido usados em larga escala no controle biológico de pragas das culturas de algodão, milho e soja, uma vez que não são considerados prejudiciais ao meio ambiente. A bactéria *B. thuringiensis* é um bastonete gram-positivo da família Bacillaceae, aeróbica não estrita, com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45 °C. A principal característica que distingue espécie de outras do mesmo gênero é a presença intracelular de cristais proteicos com atividades entomopatogênicas para várias espécies de insetos (MARTINS et al., 2010;

HUNG et al., 2016). Tais cristais proteicos são os agentes que atuam diretamente no trato digestório dos insetos-alvos, levando-os a morte.

Em vertebrados, estudos sobre os efeitos de pesticidas a base de *B. thuringiensis* são reduzidos. Em *Oreochromis niloticus*, a exposição ao *B. thuringiensis* causou toxicidade, devido a morte de eritrócitos sanguíneos provocada por necrose (OLIVEIRA-FILHO et al., 2009). Assim, este estudo teve como objetivo investigar os efeitos de pesticida a base de *B. thuringiensis* em parâmetros sanguíneos de *Piaractus mesopotamicus*, por duas vias, pela água dos tanques de cultivo e dieta alimentar.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Peixes

Foram utilizados 60 juvenis de *P. mesopotamicus* ( $121,52 \pm 28,91$  g) obtidos de piscicultura comercial de Araguaína, estado de Tocantins (Brasil) e transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Araguaína (TO). Os peixes foram aclimatados durante 30 dias em tanques de 500 L de água. Durante a aclimação foi utilizada aeração constante e condições controladas de temperatura ( $\pm 25$  °C) e pH ( $\pm 7,0$ ).

### Preparação das dietas contendo biopesticida a base *Bacillus thuringiensis*

Neste ensaio, foi usado o biopesticida Dipel®-WP (Sumitomo Chemical, Brasil), contendo *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, com esporos dessa bactéria. Foi adicionado 0,13 g desse biopesticida por kg de ração comercial para peixes carnívoros, contendo 45% de proteína bruta (PB). Foram preparadas soluções aquosas de 20 mg/L do biopesticida para imergir cada 150 g da ração comercial durante 15 minutos. Após a imersão da ração nessa solução contendo o biopesticida, essas rações foram colocadas para secar em estufa microbiológica a 37°C, durante por 12 horas, e para ativação dos esporos de *B. thuringiensis*. Foram feitos testes de crescimento bacteriano, após esse procedimento, para certificação da presença do *B. thuringiensis* nas rações. Em seguida, as rações foram usadas para alimentar *P. mesopotamicus*, durante 24 ou 48 h.

### **Procedimento de adição do biopesticida na água e dieta dos peixes**

Dois ensaios foram realizados com a adição do biopesticida a base de *B. thuringiensis* - um usando ração de *P. mesopotamicus* e outro usando a exposição dos peixes a biopesticida na água dos tanques de cultivo. Para os grupos que foram submetidos ao biopesticida diretamente nos tanques de cultivo, foram calculados o valor referente a 20 mg do biopesticida para cada litro de água do tanque (20 mg/L). Como cada tanque de 500 litros foram adicionados 10 g do biopesticida. Para os *P. mesopotamicus* que receberam dieta contendo o biopesticida, foi adotado o seguinte procedimento:

Uma ração comercial para peixes carnívoros contendo 45% de proteína bruta (PB) foi usada para adicionar 0,13 g do pesticida para cada kg de dieta, contendo os esporos de *B. thuringiensis*, e usada para alimentar *P. mesopotamicus*. Essa ração contendo os esporos foram preparadas da seguinte forma:

Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas de 20 mg/L do biopesticida para imergir cada 150 g da ração comercial durante 15 minutos. Após a imersão da ração nessa solução contendo o biopesticida, as rações foram colocadas para secar em estufa microbiológica a 37°C, durante 12 horas, e para ativação dos esporos da bactéria *B. thuringiensis*. Após esse período, as rações foram usadas para alimentar os peixes, durante 24 ou 48 horas. A preparação da ração foi feito diariamente, para evitar armazenamento.

Os espécimes de *P. mesopotamicus* foram divididos em cinco grupos: 1) Grupo Controle; 2) Grupo alimentado, por 24 horas, com contendo biopesticida; 3) Grupo alimentado por 48 horas, com contendo biopesticida; 4) Grupo exposto, por 24 horas, a água dos tanques; e 5) Grupo exposto, por 48 horas. Para cada grupo foram usados 12 peixes e 3 repetições, como 4 peixes cada. Os peixes do grupo controle foram alimentados a cada seis horas, durante 24 ou 48 horas com ração comercial sem o biopesticida, apenas umedecida com água e seca por 12 h em estufa. Os peixes do grupo ração foram alimentados a cada seis horas, durante 24 e 48 h, com as dietas contendo esporos do biopesticida. Os peixes do grupo água tiveram em contato, através da água de cultivo, com o biopesticida durante 24 e 48 horas.

### **Procedimentos de análises sanguíneas**

Amostras de sangue foram coletadas por punção do vaso caudal com seringas heparinizadas para determinação dos parâmetros sanguíneos. O hematócrito foi determinado, em duplicata, em tubo capilar heparinizado utilizando centrífuga para microhematócrito; a concentração de hemoglobina foi determinada de acordo com o método da formação de cianometahemoglobina utilizando espectrofotômetro e leitura em 540 nm e contagem do número de eritrócitos foi feita em câmara de Neubauer após a diluição do sangue em formol citrato 4%. A partir desses dados foram determinados os índices hematimétricos: VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

O sangue foi usado também para a confecção de extensões sanguíneas fixadas e coradas com o corante panótico rápido (Laborclin<sup>®</sup>). As extensões foram usadas para contagem diferencial de leucócitos e contagens de leucócitos e trombócitos totais em microscópio de luz (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

O sangue remanescente foi centrifugado para obtenção do plasma e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e usado para análises bioquímicas. O cortisol foi determinado usando do Kit DBC (CAN-E-270<sup>®</sup>) que permitiu determinação quantitativa direta desse por enzima-imunoensaio e leitura em 450 nm em leitora de microplacas. A concentração da glicose, lactato foi determinado, proteínas totais, colesterol e triglicérides usando Kit Labtest (MG, Brasil) e leitura em espectrofotômetro. Os níveis dos íons potássio ( $\text{K}^+$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloretos ( $\text{Cl}^-$ ) foram determinados usando Kit Labtest (MG, Brasil) e leitura em espectrofotômetro. A atividade da Enzima Aspartato Amino Transferase (AST) e Enzima Alanina Amino Transferase (ALT) foi determinada usando do Kit Labtest (MG, Brasil) e leitura em espectrofotômetro com comprimento de 340 nm.

### **Análises estatísticas**

Todos os dados dos parâmetros sanguíneo foram previamente avaliados nos pressupostos de normalidade e homocedasticidade usando Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para os dados com distribuição normal foi usando análise de variância (ANOVA - One Way) seguido do teste de Dunnet, para comparação entre médias.



## RESULTADOS

Em *P. mesopotamicus* expostos a água ou dieta contendo biopesticida à base de *B. thuringiensis*, nenhum peixe morreu durante o período experimental e após 24 horas do experimento. Porém, com 48 horas iniciaram-se as mortes, que atingiram 100% de mortalidade em período de 168 horas (Tabela 1). Observar que previamente a mortes dos peixes, esses apresentaram natação lenta e errática.

**Tabela 1.** Mortalidade de *Piaractus mesopotamicus* durante e após exposição ao biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*.

Período	Controle	Ensaio	
		Água	Ração
Durante o experimento	0	0	0
24 horas após experimento	0	0	0
48 horas após experimento	0	0	0
72 horas após experimento	0	1	0
96 horas após experimento	0	1	0
120 horas após experimento	0	0	0
144 horas após experimento	0	1	0
168 horas após experimento	0	2	5
Número total	0	5	5

Nos peixes expostos a água dos viveiros ou dieta contendo biopesticida à base de *B. thuringiensis*, a concentração de hemoglobina foi alterada ( $p > 0,05$ ) apenas, nos grupos expostos água, mas o hematócrito aumentou ( $p < 0,05$ ) nos dois ensaios após 24 e 48 horas quando comparado aos controles. O número de eritrócitos totais permaneceu inalterado ( $p > 0,05$ ) no grupo 24 h água, mas diminuiu ( $p < 0,05$ ) após 48 horas nos peixes expostos a bactéria na água dos tanques, e diminuiu ( $p < 0,05$ ) também após 24 horas nos peixes alimentados com ração contendo *B. thuringiensis* quando comparado aos controles.

O VCM e a HCM aumentaram ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos, nos dois tratamentos, contendo biopesticida à base de *B. thuringiensis*, após 24 e 48 horas quando comparado aos controles, enquanto o CHCM permaneceu inalterada ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros hematológicos em *Piaractus mesopotamicus* expostos ao biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

<b>Ensaio na água</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Hematócrito (%)	22,0±3,3 <sup>a</sup>	31,23±3,2 <sup>b</sup>	31,8±3,3 <sup>b</sup>
Hemoglobina (g/dL)	4,9±0,7 <sup>a</sup>	5,9±0,2 <sup>b</sup>	5,9±0,6 <sup>b</sup>
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /μL)	2,039±0,150 <sup>a</sup>	1,870±0,100 <sup>a</sup>	1,690±0,310 <sup>b</sup>
VCM (fL)	105,4±20,4 <sup>a</sup>	155,6±29,1 <sup>b</sup>	185,9±46,6 <sup>b</sup>
HCM (g/dL)	25,0±4,4 <sup>a</sup>	33,2±2,7 <sup>b</sup>	33,6±3,4 <sup>b</sup>
CHCM (g/dL)	22,0±3,0 <sup>a</sup>	21,6±4,0 <sup>a</sup>	18,5±3,3 <sup>a</sup>
<b>Ensaio na ração</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Hematócrito (%)	22,0±3,3 <sup>a</sup>	29,4±3,5 <sup>b</sup>	33,1±1,6 <sup>b</sup>
Hemoglobina (g/dL)	4,9±0,7 <sup>a</sup>	5,4±0,7 <sup>a</sup>	6,0±0,7 <sup>b</sup>
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> /μL)	2,039±0,150 <sup>a</sup>	1,700±0,210 <sup>b</sup>	1,660±0,220 <sup>b</sup>
VCM (fL)	105,4±20,4 <sup>a</sup>	173,1±44,6 <sup>b</sup>	196,5±20,6 <sup>b</sup>
HCM (g/dL)	25,0±4,4 <sup>a</sup>	34,5±6,4 <sup>b</sup>	37,9±4,9 <sup>b</sup>
CHCM (g/dL)	22,0±3,0 <sup>a</sup>	19,8±3,8 <sup>a</sup>	18,7±2,0 <sup>a</sup>

Valores expressam médias ± desvio padrão. VCM: Volume corpuscular médio, HCM: Hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os controles, de acordo com ANOVA, seguido do pós-teste Dunnett.

O número de trombócitos não mostrou qualquer alteração em todos os peixes mantidos com dieta e água contendo o biopesticida. O número de leucócitos totais aumentou ( $p < 0,05$ ) a partir de 24 horas, permanecendo aumentando ( $p < 0,05$ ) durante 48 horas, nos peixes expostos ao biopesticida na água dos tanques, enquanto os animais alimentados com ração contendo o biopesticida aumentaram ( $p < 0,05$ ) em 48 horas da alimentação. Peixes expostos a água contendo *B. thuringiensis*, mostraram aumento ( $p < 0,05$ ) no número de linfócitos após 24 e 48 horas, permanecendo inalterado ( $p < 0,05$ ) nos peixes alimentados com ração contendo a bactéria, quando comparados ao grupo controle. O número de neutrófilos, monócitos, eosinófilo e LG-PAS aumentou ( $p < 0,05$ ) apenas após 24 horas de exposição ao biopesticida na água dos tanques, quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

**Tabela 3.** Trombograma e leucograma de *Piaractus mesopotamicus* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

<b>Ensaio com água</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Trombócitos (µL)	118.363±269.630 <sup>a</sup>	141.457±39.475 <sup>a</sup>	140.107 ±31273 <sup>a</sup>
Leucócitos (µL)	82.268±8.033 <sup>a</sup>	196.099 ±51.700 <sup>b</sup>	191.208 ±58.213 <sup>b</sup>
Linfócitos (µL)	31.999±4.816 <sup>a</sup>	75.122 ±24.671 <sup>b</sup>	101.390±28.526 <sup>b</sup>
Neutrófilos (µL)	37.973±7.349 <sup>a</sup>	78.225±21.645 <sup>b</sup>	63.505±21.416 <sup>a</sup>
Monócitos (µL)	3.729±1.090 <sup>a</sup>	11.782±4.380 <sup>b</sup>	6.961±3.494 <sup>a</sup>
Eosinófilos (µL)	5.284±2.067 <sup>a</sup>	13.604±3.236 <sup>b</sup>	3.393±1.675 <sup>a</sup>
LG-PAS (µL)	5.0±1.1 <sup>a</sup>	8.5±1.8 <sup>b</sup>	6.1±1.0 <sup>a</sup>
<b>Ensaio com ração</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Trombócitos (µL)	118.363±269.630 <sup>a</sup>	146.611±31.540 <sup>a</sup>	132.170 ±23.646 <sup>a</sup>
Leucócitos (µL)	82.268±8.033 <sup>a</sup>	113.903 ±42.173 <sup>a</sup>	158.166 ±53.89 <sup>b</sup>
Linfócitos (µL)	31.999±4.816 <sup>a</sup>	48.527±16.314 <sup>a</sup>	59.663 ±15.894 <sup>a</sup>
Neutrófilos (µL)	37.973±7.349 <sup>a</sup>	48.276±2.481 <sup>a</sup>	67.727±25.097 <sup>a</sup>
Monócitos (µL)	3.729±1.090 <sup>a</sup>	4.164±941 <sup>a</sup>	5.836±2.321 <sup>a</sup>
Eosinófilos (µL)	5.284±2.067 <sup>a</sup>	4.918±1.750 <sup>a</sup>	5.617±2.460 <sup>a</sup>
LG-PAS (µL)	5.0±1.1 <sup>a</sup>	6.8±1.5 <sup>a</sup>	6.3±1.6 <sup>a</sup>

Valores expressam média ± desvio padrão. LG-PAS: Leucócito granular PAS-Positivo. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os controles, de acordo com ANOVA, seguido do pós-teste Dunnett.

As concentrações plasmáticas de proteínas totais reduziram ( $p < 0,05$ ) nos peixes alimentados com ração contendo o biopesticida após 24 e 48 horas, mas os peixes submetidos a água com biopesticida não mostraram alterações significativas ( $p > 0,05$ ). Os níveis de colesterol reduziram ( $p < 0,05$ ) nos peixes com exposição água com biopesticida após 24 horas e 48 horas, e aumentou ( $p < 0,05$ ) nos grupos submetidos ao biopesticida via a dieta em 24 horas e 48 horas. As concentrações de triglicerídeos reduziram ( $p < 0,05$ ) em 24 e 48 horas nos peixes expostos a bactéria pela água, bem como nos peixes que receberam dieta com biopesticida em 24 horas, mas aumentaram ( $p < 0,05$ ) nos peixes que receberam dieta com biopesticida em 48 horas (Tabela 4).

Em peixes expostos a água contendo *B. thuringiensis* a concentração de  $\text{Na}^+$  e ALT aumentou ( $p < 0,05$ ) em 24h e 48h e reduziu em peixes que receberam ração com biopesticida após 48, quando comparado com os peixes controles. Os níveis de  $\text{K}^+$  reduziram nos peixes expostos pela água com biopesticida após 24 horas, e nos peixes que receberam dietas com biopesticida, após 24 e 48 horas. Os níveis de  $\text{Cl}^-$  aumentaram nos expostos a biopesticida na água e reduziram nos peixes que receberam ração com biopesticida, após 48, quando comparados aos controles. As concentrações de AST não foram alteradas em nenhum tratamento com biopesticida (Tabela 4).

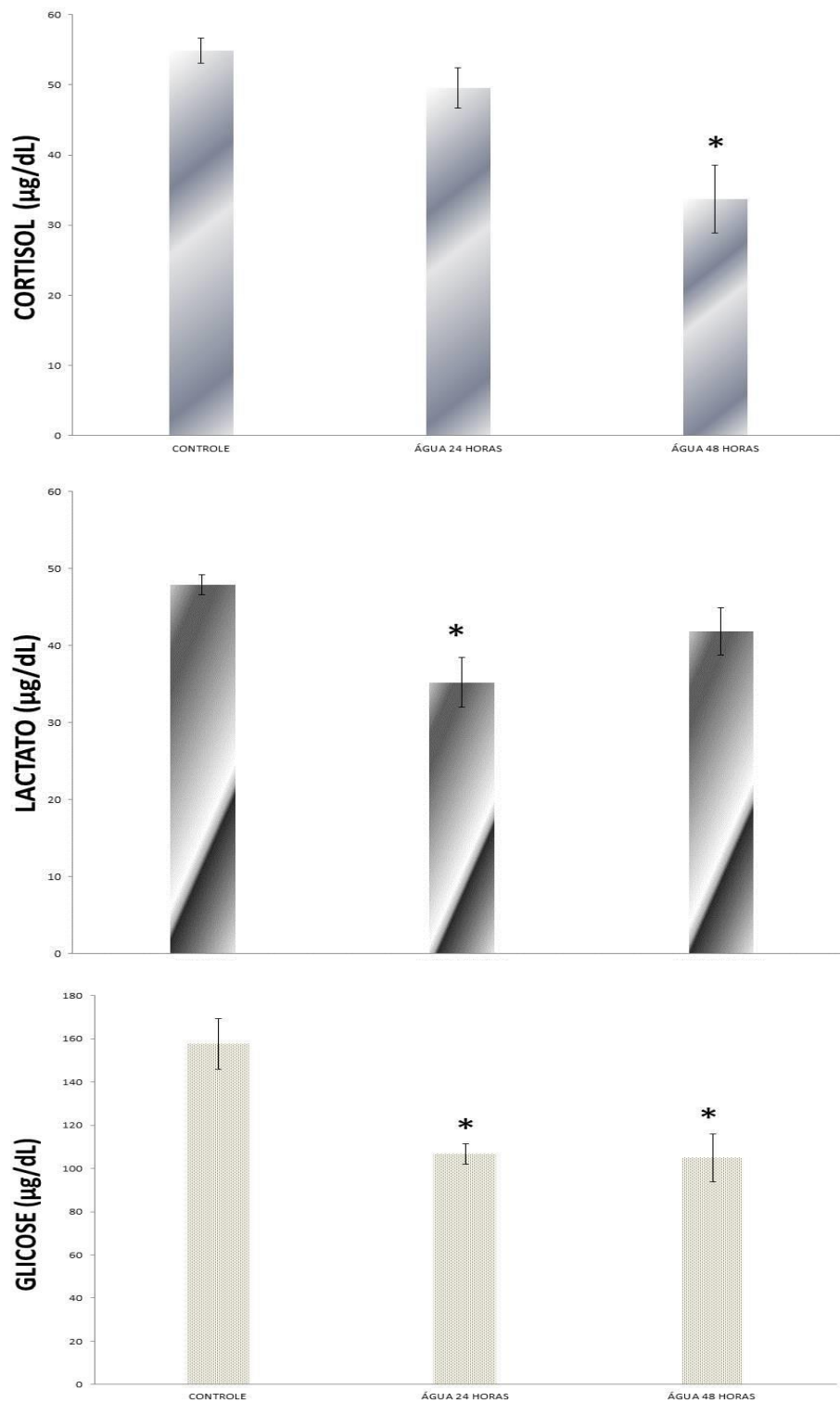
**Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos plasmáticos de *Piaractus mesopotamicus* expostos a biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*.

<b>Ensaio na água</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Proteínas (g/dL)	7,2±0,4 <sup>a</sup>	5,8±0,8 <sup>a</sup>	7,5±0,3 <sup>a</sup>
Colesterol (mg/dL)	119,8±13,0 <sup>a</sup>	145,8±27,2 <sup>b</sup>	185,6±15,0 <sup>b</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	144,2±15,1 <sup>a</sup>	64,1±3,8 <sup>b</sup>	63,8±6,7 <sup>b</sup>
$\text{Na}^+$ (mmol/L)	105,3±52,7 <sup>a</sup>	382,1±49,4 <sup>b</sup>	318,7±28,4 <sup>b</sup>
$\text{K}^+$ (mmol/L)	15,5±0,9 <sup>a</sup>	13,3±2,6 <sup>a</sup>	11,3±0,9 <sup>b</sup>
$\text{Cl}^-$ (mmol/L)	64,4±10,1 <sup>a</sup>	82,4±6,5 <sup>b</sup>	65,8±19,6 <sup>a</sup>
AST (UL)	13,1±6,6 <sup>a</sup>	9,3±3,1 <sup>a</sup>	16,6±7,9 <sup>a</sup>
ALT (UL)	9,7±7,6 <sup>a</sup>	21,1±9,0 <sup>b</sup>	24,9±13,7 <sup>b</sup>
<b>Ensaio na ração</b>			
<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
Proteínas (g/dL)	7,2±0,4 <sup>a</sup>	5,7±1,5 <sup>b</sup>	4,8±0,8 <sup>b</sup>
Colesterol (mg/dL)	119,8±13,0 <sup>a</sup>	81,2±15,0 <sup>b</sup>	71,1±10,7 <sup>b</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	144,2±15,1 <sup>a</sup>	58,8±4,9 <sup>b</sup>	181,78±27,2 <sup>b</sup>
$\text{Na}^+$ (mmol/L)	105,3±52,7 <sup>a</sup>	110,4±39,2 <sup>a</sup>	59,1±29,6 <sup>b</sup>
$\text{K}^+$ (mmol/L)	15,5±0,9 <sup>a</sup>	11,7±1,9 <sup>b</sup>	11,6±1,8 <sup>b</sup>
$\text{Cl}^-$ (mmol/L)	64,4±10,1 <sup>a</sup>	53,8±10,7 <sup>a</sup>	45,6±6,4 <sup>b</sup>
AST (UL)	13,1±6,6 <sup>a</sup>	17,7±4,9 <sup>a</sup>	20,3±6,9 <sup>a</sup>
ALT (UL)	9,7±7,6 <sup>a</sup>	16,1±6,3 <sup>a</sup>	26,7±10,2 <sup>b</sup>

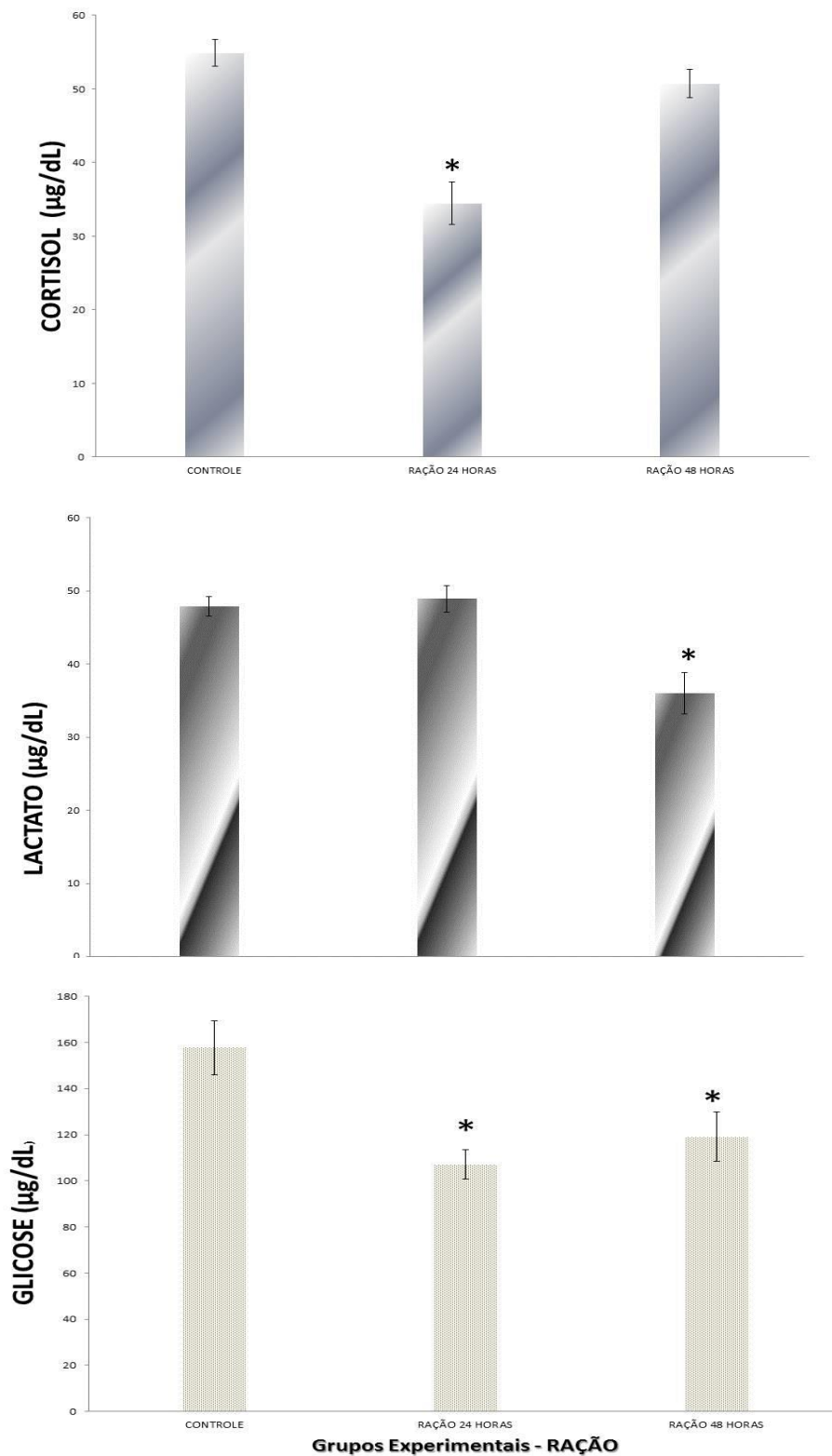
Valores expressam média ± desvio padrão. AST: Enzima Aspartato Amino Transferase; ALT: Enzima Alanina Amino Transferase. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os controles, de acordo com ANOVA, seguido do pós-teste Dunnett.

Em *P. mesopotamicus* expostos a água com biopesticida à base de *B. thuringiensis* nos níveis de cortisol reduziram ( $p < 0,05$ ) nos grupos água 48 horas e ração 24 horas, enquanto a glicemia mostrou redução em todos os ensaios, tanto pela água como dieta, quando comparado com o grupo controle. A concentração de lactato reduziu ( $p < 0,05$ ) nos grupos experimenta: água 24 horas e ração 48 horas, em relação ao grupo controle (Figuras 1 e 2).

Em *P. mesopotamicus* expostos a água com biopesticida à base de *B. thuringiensis* nos níveis de cortisol reduziram ( $p < 0,05$ ) nos grupos água 48, enquanto a glicemia mostrou redução em 24 e 48 horas quando comparada com os peixes controles. A concentração de lactato reduziu ( $p < 0,05$ ) nos peixes somente após 24 horas de exposição, em relação aos controles (Figura 1). Em peixes alimentados com dietas contendo biopesticida à base de *B. thuringiensis* nos níveis de glicose reduziram ( $p < 0,05$ ) após 24 e 48 horas de alimentação, enquanto os níveis de cortisol reduziram após 48 horas e os níveis de lactato reduziram ( $p < 0,05$ ) após 24 horas, quando comparados aos peixes controles (Figura 2).



**Figura 1.** Concentração plasmática de cortisol, lactato e glicose em *Piaractus mesopotamicus* expostos a água com biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Valores expressam média e desvio padrão da média. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com ANOVA seguido do pós-teste Dunnet.



**Figura 2.** Concentração plasmática de cortisol, lactato e glicose em *Piarractus mesopotamicus* alimentados com ração contendo biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. Valores expressam média e desvio padrão da média. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de acordo com ANOVA seguido do pós-teste Dunnet.

## DISCUSSÃO

Tem sido postulado que biopesticidas à base de *B. thuringiensis*, usados na produção agrícola há mais de 30 anos, não causam danos a organismos não-alvos tais como homem, animais silvestres e insetos benéficos (POLANCZYK, 2004; MALAJOAVICH, 2012). Porém, este estudo mostrou que 100% dos *P. mesopotamicus* expostos a água e ração com biopesticida a base de *B. thuringiensis*, morreram após 48 e 168 horas dos ensaios. Além disso, após 24 horas da exposição houve alterações no comportamento desses peixes tais como natação lenta e errática, bem como redução na alimentação. Tais alterações parecem ter sido afetadas pelo sistema fisiológico e nervoso dos peixes. Em contraste, Oliveira-Filho *et al.* (2009) mostraram que *Danio rerio* e *O. niloticus* expostos a água contendo *B. thuringiensis* não apresentaram mortalidade, devido as baixas concentrações de esporos usadas nos ensaios. Pesticidas químicos podem afetar o sistema nervoso inibindo a ação de colinesterase, comprometendo assim as funções fisiológicas e motoras (VENTURINI *et al.*, 2014).

O hematócrito é um bom indicador dos efeitos dos diversos fatores ambientais que os peixes estão sujeitos (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). O hemograma de *P. mesopotamicus* exposto à bactéria *B. thuringiensis* mostrou uma redução no número de eritrócitos totais e aumento do hematócrito e concentração de hemoglobina. Esse aumento no hematócrito foi causado pelos eritrócitos imaturos (eritroblastos), como indicado pelo VCM aumentado. Porém, em *Colossoma macropomum* utilizando também este mesmo biopesticida a base de *B. thuringiensis*, na concentração 20 mg/L, não houve alteração no hematócrito e hemoglobina, e o número de eritrócitos também diminuiu nos peixes alimentados com dieta contendo esses biopesticida (MARIANO *et al.*, 2017). Porém, em *P. mesopotamicus* expostos a 0,4 mg/L<sup>1</sup> de triclorfon, foi relatado redução no número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina (TAVARES-DIAS *et al.*, 1999). Tais resultados demonstram que esses parâmetros respondem de forma distinta aos diferentes estressores ambientais. Além disso, alterações hematológicas por exposição a bactérias variam de acordo com o agente etiológico, sua patogenicidade e virulência. Biopesticidas a base de *B. thuringiensis* são microrganismos que causam doenças em insetos-alvos, devido à presença de toxinas específicas (MARIANO *et al.*, 2015) e alterações sanguíneas em peixes.

Em geral, as respostas a estresse estão associadas à diminuição da função do sistema imunológico e capacidade dos peixes de responderem aos patógenos. Porém, essa



resposta é dependente da intensidade e duração do evento, assim pode ocorrer também uma ativação células imunológicas (TOR, 2011; URBINATI et al., 2015). Em *P. mesopotamicus* expostos ao biopesticida a base de *B. thuringiensis*, houve leucocitose devido ao aumento no número de linfócitos e neutrófilos. Os linfócitos são leucócitos envolvidos, principalmente na produção de imunoglobulinas e modulação da defesa. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos fagocíticos em resposta às infecções (SANTOS e TAVARES-DIAS, 2011; RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Em peixes, as alterações iônicas podem ser causadas por moduladores de estresse. O cortisol exerce ambos os efeitos - mineralocorticoide e glicocorticoides, diferentemente dos mamíferos em que a atividade mineralocorticoide é exercida em grande parte pela aldosterona (MOMMSEN et al., 1999). Os efeitos secundários podem mobilizar ajustes metabólicos nos níveis plasmáticos de glicose, lactato e glicogênio, cloreto, sódio, potássio, proteínas e osmolaridade (URBINATI et al., 2015). Porém, em *P. mesopotamicus*, as alterações nas concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  parece não ter sido influenciado pelo cortisol, uma vez que esse hormônio apresentou alteração (redução) apenas em peixes expostos a água com *B. thuringiensis*, após 48 horas e na dieta após 24 horas de alimentação. As alterações iônicas parecem ter ocorrido via brânquias que atuam no equilíbrio iônico e osmótico em peixes de água doce. As células do epitélio branquial respondem direta ou indiretamente aos fatores ambientais e alterações do organismo (LUPI et al., 2007). Assim, um possível aumento na perfusão das lamelas secundárias de *P. mesopotamicus* pode ter sido estimulado pelas catecolaminas, favorecendo a tomada de oxigênio acompanhado por aumento na permeabilidade das membranas, favorecendo a perda de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) para o ambiente e vice-versa (MORON et al., 2006).

A análise da atividade de enzimas específicas é muito utilizada para verificar como o metabolismo animal reage a diferentes condições, sendo possível diagnosticar situações metabólicas adversas (CAMPELO, 2015). As transaminases AST e ALT são importantes no processo de catabolismo dos aminoácidos e são disponibilizadas na corrente sanguínea quando há danos teciduais, em especial em células hepáticas tais como hepatócitos (AMACHER 2002; MOSER, 2005; PAULINO, 2015). Em *P. mesopotamicus* deste estudo, o aumento das concentrações plasmáticas da transaminase ALT sugere possíveis danos teciduais hepáticos, uma vez que essa enzima é encontrada predominantemente no fígado (SPARLING et al., 1998). Porém, como não houve alterações nos níveis plasmáticos da atividade da transaminase AST, isso sugere que coração e músculos esqueléticos não foram comprometidos pela ação do *B. thuringiensis*.

Em geral, os níveis plasmáticos de proteínas, triglicerídeos, glicose e colesterol em *P. mesopotamicus* expostos à *B. thuringiensis* apresentaram uma redução, devido a reduzida ingestão de alimentos, que afetou as reservas de açúcares, lipídeos e proteínas, causada pela aumentada demanda energética.

Em peixes, níveis de glicose, lactato e cortisol sanguíneo são frequentemente usados como indicadores fisiológicos sensíveis ao estresse (WENDEMEYER e MCLEAY, 1981; WEENDELAAR-BONGA, 1997; BARTON, 1997). A exposição ao biopesticida a base de *B. thuringiensis* pela dieta, demonstrou situação estressante em *P. mesopotamicus*, em 24 e 48 horas, baseado no aumento da glicemia e lactato.

## CONCLUSÕES

Os resultados mortalidade e efeitos fisiológicos deletérios em *P. mesopotamicus* expostos ao biopesticida à base de *B. thuringiensis*, tanto na água dos tanques como e na dieta. Embora as concentrações usadas do biopesticida levaram a alguns ajustes sanguíneos e não afetaram a homeostasia, concentrações mais elevadas podem ser mais nocivas à saúde dos peixes. Portanto, devido ao estreito contato dos peixes com o ambiente aquático e os efeitos de poluentes biopesticidas, o produtor deve estar atento a dispersão desses produtos agrícolas nos viveiros de cultivo.

## REFERÊNCIAS

- ACHER, D.E. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. **Hum. Exp. Toxicol**, 21:253–262, 2002.
- ANGELO, E.A.; VILAS-BOAS. G.T.; CASTRO-GOMEZ, R.J.H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, 31(4):945-958, 2010.
- BARTON, B.A. Stress in finfish: past, present and future a historical perspective. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge University Press, 62:1-33, 1997.
- BOIJINK, C.L.; BRANDÃO, D.A. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophyla* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). **Cienc. Rural**, 31:503-507, 2001.
- CAMPELO, D.A.V. Exigências dietéticas de lisina e metionina para fêmeas de lambarido-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) na terminação. **Tese de doutorado**. Maringá (PR). 91p. 2015.
- GUSMÃO, F.P. **Biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis***. USP – Lorena (SP). 42p, 2013.

HUNG, C.H.; KANEHARA, K.; NAKAMURA, Y. In vivo reconstitution algal Triacylglycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Front Microbiol**, 7:70-81, 2016.

LUPI, C. NHACARINI, N.I.; MAZON, A.F; SÁ, O.R. Avaliação da poluição ambiental através das alterações nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro (SP). **Revista Fafibe**, 3:1-6, 2007.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**. Instituto de Tecnologia. Rio de Janeiro, 2012.

MARIANO, W. S.; MORON, S. E.; GARCIA, R.G.; TAVARES-DIAS. Impactos de pesticidas e biopesticidas na aquicultura. In: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Pedro & João Ed., São Carlos (SP). 2:621-638. 2015.

MARIANO, W.S.; SOUSA, F.L.G.; TAVARES-DIAS, M.; RODRIGUES, R.C.; AZEVEDO, S.B.; LIMA, J.O. Estudo hematológico de tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetido à concentração subletal de biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Sodebras**, 12(135):161-167, 2017.

MARTINS, C. I. M.; EDING, E. P.; VERRETH, J. A. J. The effect of recirculating aquaculture systems on the concentrations of heavy metals in culture water and tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Food Chemistry**, 126(3):1001-1005, 2010

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M.M; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol. Fisheries**, 9:211-268, 1999.

MORON, S.E.; POLEZ, V.L.P.; ARTONI, R.A.; RIBAS, J.L.C; TAKAHASHI, H.K Estudos de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* expostos ao herbicida Atrazina. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**. 1(1):1-4, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; RAMOS, F.R.; MUNIZ, D.H.F.; LOPES, M.C.; OLIVEIRA, R. S.; ALVES, R. T.; GRISOLIA, C. K.; MONNERAT, R.G. **Avaliação dos efeitos adversos de entomopatógenos sobre peixes e camundongos**. Planaltina (DF): Embrapa Cerrados. 20p. 2009.

PAULINO, M.G. Efeitos do extrato bruto da cianobactéria *Radiocystis fenandoi* no teleóstio, *Hoplia malabaricus*. **Tese de doutorado**, UFSCAR, São Carlos, 141p. 2015.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. Tese de doutorado – USP. Piracicaba, 2004.

RANZANI-PAIVA, M. J.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para Análise Hematológica em Peixes**. Eduem ed. Maringá (PR). 2013.

SANTOS, R. B. S.; TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio Rio Solimões, **Boletim do Instituto de Pesca**. 36:283-292, 2010.

SPARLING, G. VOJVODIC-VUKOVIC, M.; SCHIPPER, L.A. Hot-water-soluble C as a simple measure of labile soil organic matter: the relationship with microbial biomass. **C. Soil Biol. Biochem**, 30:1469-1472, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.; CAMPOS-FILHO, E. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16(1): 175 – 184, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Villimpres Complexo Gráfico, Ribeirão Preto (SP). 144 p. 2004.

TIERNEY, K.; FARREL, A.P. KENNEDY, C.J. The differential leukocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culea inconstans* and *Pimephales promelas*. **J. Fish Biol.**, 65: 906-919. 2004.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**. 35:1366-1375, 2011.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; SERRA; WOLKERS. C. P.; SABIONI, R.E. Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas. In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W. S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. Pedro & João Ed., São Carlos (SP). 1:381-416. 2015

VENTURINI, F. P., MORAES, MORAES, F.D., CORTELLA, L. R. X., ROSSI, C. C., MORAES, G. Metabolic effects of trichlorfon (Masoten®) on the neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish Physiol. Biochem**. 41(1):299-309, 2015.

WENDEELAR BONGA, S.E. **The stress response in fish. Physiol.**, 77:591-625, 1997.

WEDEMEYER, G. MCLEAY, D.J. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stress on fish health U.S. Tec. Pap. U.S. **Fish Wildl. Serv**. 89:1-18, 1981.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ *Arapaima gigas* e *P. mesopotamicus* após ensaios com biopesticida a base de *B. thuringiensis* atingiram 100% de mortalidade.
- ✓ *Arapaima gigas*, após 24 e 48 h da alimentação com dietas contendo biopesticida a base de *B. thuringiensis* apresentaram alterações histopatológicas tais vacuolização citoplasmática, hipertrofias e atrofia nucleares, estabilização biliar e alguns casos de necroses hepáticas, atrofia glomerular, estreitamento da luz tubular, hipertrofia celular e nuclear, presença de centros de melanomacrófagos, e casos de necroses nos rins, além de modificações no epitélio intestinal caracterizados por mudanças nas vilosidades e células. A maioria dessas alterações histopatológicas foram consideradas leves e moderadas.
- ✓ *Arapaima gigas* e *P. mesopotamicus* após 24 e 48 h da alimentação com dietas e banhos com água, ambos contendo biopesticida a base de *B. thuringiensis* desenvolveram alterações eritrocitárias e leucocitárias aparentemente reversíveis.
- ✓ *Arapaima gigas* e *P. mesopotamicus* após 24 e 48 h da alimentação com dietas e banhos com água, ambos contendo biopesticida a base de *B. thuringiensis* apresentaram ajustes bioquímicos, em alguns grupos experimentais, caracterizados pelo perfil nutricional, com alterações nos níveis de proteínas, colesterol e triglicerídeos; desequilíbrios iônicos e nas transaminases hepáticas AST e ALT.
- ✓ Os resultados deste estudo demonstraram que a utilização de biopesticidas a base de *B. thuringiensis* pode ser menos nociva aos peixes quando comparados a pesticidas químicos; mas não se pode afirmar que os mesmos são inofensivos a espécies não-alvos tais como peixes.
- ✓ Estudos usando concentrações mais elevadas de biopesticidas a base de *B. thuringiensis* podem mostrar alterações fisiológicas e histopatológicas mais severas.