



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
ENGENHARIA DE AQUICULTURA**

JULIANA HÖSEL DE CARVALHO

**TESTE DE LETALIDADE DE PEIXES DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* (QUOY;
GAIMARD, 1824) SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
EXTRATO DE ACÍCULAS DE *Pinus elliottii* (ENGELM, 1880)**

LARANJEIRAS DO SUL

2016

JULIANA HÖSEL DE CARVALHO

**TESTE DE LETALIDADE DE PEIXES DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* (QUOY;
GAIMARD, 1824) SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
EXTRATO DE ACÍCULAS DE *Pinus elliottii* (ENGELM, 1880)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Romão

LARANJEIRAS DO SUL

2016

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Carvalho, Juliana Hösel de
Teste de letalidade de peixes da espécie *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de extrato de acículas de *Pinus elliottii*/ Juliana Hösel de Carvalho. -- 2016.
59 f.:il.

Orientador: Silvia Romão.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Engenharia de aquicultura, Laranjeiras do Sul, PR, 2016.

1. Extrato de acícula de *Pinus elliottii* como tratamento alternativo ao parasita *Lernaea cyprinacea* em *Rhamdia quelen*. 2. Identificação da concentração letal média (CL-50) para o extrato de *Pinus elliottii* em juvenis de *Rhamdia quelen*. 3. Histologia de rim, fígado e brânquias de juvenis de *Rhamdia quelen* submetidos ao extrato de *Pinus elliottii*. I. Romão, Silvia, orient.

II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

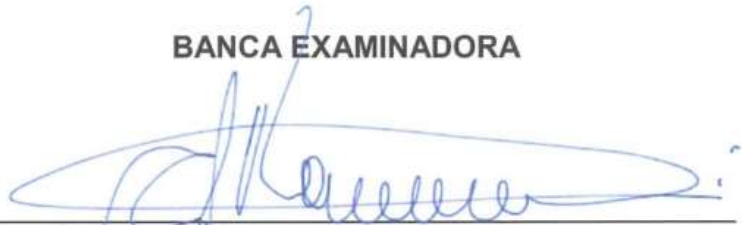
JULIANA HÖSEL DE CARVALHO

**TESTE DE LETALIDADE DE PEIXES DA ESPÉCIE *Rhamdia quelen* (QUOY;
GAIMARD, 1824) SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
EXTRATO DE ACÍCULAS DE *Pinus elliottii* (ENGELM, 1880)**

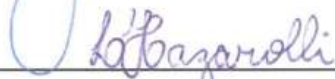
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi defendido e aprovado pelo Programa de Graduação do Curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Laranjeiras do Sul, 15 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Médico Veterinário Carlos Jose Raupp Ramos, MSc. Professor na UFFS



Farmacêutica Luisa Cazarolli, Dra Professora na UFFS



Bióloga Silvia Romão, Dra Professora na UFFS

Dedico este trabalho à minha filha Gabriela, que me trouxe paz e companheirismo nos momentos difíceis desta etapa da minha vida, sendo a principal razão para me fazer seguir em frente e não desistir. Com ela, tenho a certeza de que nunca estarei sozinha.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Doutora Silvia Romão, pelos ensinamentos valiosos, paciência e disponibilidade de tempo para a realização deste trabalho de conclusão de curso, entre outros trabalhos e disciplinas. Com ela tenho a total certeza de que colhi bons frutos dentro desta instituição.

A todos os meus colegas e professores do projeto de extensão “Identificação e Organização do Sistema Produtivo de Piscicultores da Região de Laranjeiras do Sul: Aspectos associados ao Manejo, Monitoramento Ambiental, Controle Sanitário e Controle do Sistema de Produção – PROEXT”. Quero agradecê-los pela amizade, apoio e ajuda. Com certeza nós aprendemos muitas coisas juntos, um auxiliando ao outro, crescendo juntos!

Agradecer ao meu colega e amigo de sala de aula e projeto de extensão Antonio Carlos Amaral Farias, pois participou ativamente durante a execução desta pesquisa.

Aos técnicos de laboratório Marcelo e Frank, e bibliotecária Maria pelo auxílio na prática e escrita deste trabalho.

À minha filha Gabriela, pelo amor e pela companhia em todos os dias.

Aos meus pais Ivone e Antonio que me incentivaram durante todos esses anos que estive na universidade, ajudando a cuidar da minha filha Gabi, para que eu pudesse seguir em frente com os estudos.

Agradecer ao meu irmão Fabiano, cunhada Keli e sobrinho Gustavo Henrique.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

CARVALHO, Juliana Hösel de. **Teste de Letalidade de Peixes da Espécie *Rhamdia quelen* (Quoy; Gaimard, 1824) Submetidos a Diferentes Concentrações de Extrato de Acículas de *Pinus elliottii* (Engelm, 1880)**. Laranjeiras do Sul, PR. 2016. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal da Fronteira Sul, UFFS, 2016.

RESUMO

A piscicultura continental vem crescendo de maneira exponencial nos últimos anos. Contudo, a falta de cuidados profiláticos, manejo e planejamento podem estar relacionados a sérios riscos à condição sanitária da produção. No município de Laranjeiras do Sul – PR, foi verificada a presença do parasita de peixes *Lernaea cyprinacea*, e uma das principais espécies afetada foi o *Rhamdia quelen*. Este parasita, quando se fixa no hospedeiro, age diretamente proporcionando ferimentos, e indiretamente como vetor de doenças secundárias bacterianas e virais. Procedimentos utilizando extrato de acículas de *Pinus elliottii* como princípio ativo foram recomendados alternativos à utilização de produtos químicos no controle desta infestação, contudo, ainda não existem estudos da segurança das dosagens recomendadas. Este trabalho tem como objetivo identificar a concentração letal média (CL-50) para extrato bruto aquoso de *P. elliottii*. O preparo dos extratos em concentrações de 0,07, 0,7, 0,8, 1,1, 1,2, 2,2, 3,2, 4,2, 6,7 g/L foram macerados e deixados imersos em água por 24 horas. Os extratos foram introduzidos em aquários contendo 30 litros de água e 12 peixes cada, e acompanhados por 24 horas, verificando presença de peixes mortos. Ao término deste período, os animais foram eutanasiados para coleta de brânquias, fígado e rim para análises histológicas. O total de mortos foram utilizados para estimativa da CL-50. Para as análises histológicas, os órgãos passaram por procedimentos de desidratação, séries alcoólicas, diafanização em xilol, inclusão em parafina, cortes em micrótomo, coloração das lâminas com Hematoxilina de Harris e Eosina e análise ao microscópio. A CL-50 estimada foi de 0,963 g/L, com intervalos de confiança de 0,802 g/L e 1,125 g/L. Analisando as lâminas dos órgãos, observou-se alterações drásticas nos animais sobreviventes como desorganização na estrutura branquial com hipertrofia das células epiteliais. Nos rins foram encontradas regiões tubulares com degeneração celular apresentando citoplasma pálido, vacuolizados, hemorragias nos túbulos, infiltração leucocitária, restos de reações inflamatórias e glomérulos dilatados. No fígado encontrou-se migração leucocitária e distúrbios hematológicos. Apesar das alterações encontradas, a dose letal foi 48 vezes maior que a recomendada, indicando relativa segurança na concentração de tratamento.

Palavras-chave: Piscicultura continental. *Lernaea cyprinacea*. Jundiá. *Pinus*. CL-50.

ABSTRACT

The continental pisciculture come expanding exponential mode the last years. Although, the absence prophylaxis care, management and projection and sanitation condition of the production, in the ill success. In Laranjeiras do Sul - PR, went seen the present fish parasite call *Lernaea cyprinacea*, and on species of fish affected went the *Rhamdia quelen*. This parasite when fix in the host, acts directly by providing injuries, and indirectly as a vector of bacterial and viral secondary diseases. Therapeutics proceding utilizing leaf extract of the *P. elliottii* like active principle went recommend like alternative for utilization for chemist products in the control this disease. Although, yet no exist study in the security of the quantity for this proceeding. This work has like objective to identify the medium lethal concentration (CL-50) for aqueous brute extract for *P. elliottii*. The extract of the *P. elliottii*, in concentration 0.07, 0.7, 0.8, 1.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 6.7 g/L went prepared with immersion of maceration in water by 24 hours. The extract went introducet in the aquariums and this went accompanied by 24 hours, checking the present of the dead fishes. The end this period, the animals were euthanized in eugenol 100 mg/L for collecting gills, liver and kidney for histological analysis. The total of dead were used CL-50 for analysis of Probit. To make the histological analysis, the organs collected passed for procedures of dehydration, alcoholic series, diaphanization in xylol, paraffin embedment, microtome cuts, blade coloring with Hematoxylin of Harris and Eosin and microscope analysis. The CL-50 estimaded was of 0,963 g/L, with confidence interval of 0,802 g/L and 1,125 g/L. Analysing slides of organs, it was observed drastic changes of animals survivors, as desorganization in the branchial structure with epithelial cell hypertrophy. In the kidneys were found tubular regions with cellular degeneration presenting pale cytoplasm, vacuolated, tubule hemorrhages, leukocyte infiltration, remmants of inflammatory reactions and dilated glomeruli. In the liver was found leukocyte migration and hematological disturbances. Despite the histological alterations found, the lethal dose was 48 times higher than recommended for treatment, indicating relative safety in treatment concentration.

Keywords: Continental pisciculture. *Lernaea cyprinacea*. Jundia. Pinus. CL-50.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Lernaea cyprinacea</i>	16
Figura 2 - Fêmea de <i>L. cyprinacea</i>	17
Figura 3 - Ciclo de vida da <i>L. cyprinacea</i>	18
Figura 4 - <i>L. cyprinacea</i> inserida em nadadeira dorsal (A) e caudal (B) de <i>R. quelen</i>	19
Figura 5 - <i>R. quelen</i> infestado por <i>L. cyprinacea</i> em olhos (A), opérculo (B), tegumento (C) e nadadeira peitoral (D).....	20
Figura 6 - Exemplar de <i>P. elliotii</i> (pinus).....	23
Figura 7 - Acícula de <i>P. elliotii</i>	24
Figura 8 - Exemplar de <i>R. quelen</i> (jundiá).....	25
Figura 9 - Esquema de um arco branquial com filamentos e lamelas (hachurado). As setas indicam o seu fluxo sanguíneo.	28
Figura 10 - Esquema de um filamento branquial com três lamelas. As setas sinuosas indicam a direção do fluxo da água, e as pequenas, a direção da corrente sanguínea.	28
Figura 11 - Localização do rim em peixe.....	30
Figura 12 - Sistema digestório de peixe mostrando a localização do fígado.....	32
Figura 13 – Aclimatação dos juvenis de <i>R. quelen</i>	34
Figura 14 – Acículas de <i>P. elliotii</i> sendo maceradas e pesadas.....	34
Figura 15 – Acículas de <i>P. elliotii</i> prontas para serem imersas em água.....	35
Figura 16 – Juvenis de <i>R. quelen</i> submetidos ao teste da CL-50 com <i>P. elliotii</i>	36
Figura 17 – Equipe de trabalho realizando coleta de brânquias, fígado e rins.....	36
Figura 18 - Inclusão em parafina (A e B); estufa utilizada para séries de parafina (C); preparo da parafina para corte em micrótomo (D, E e F).....	37
Figura 19 – Micrótomo (A e B); “banho Maria” para esticar o corte (C e D); lâminas secando em chapa quente (E).....	38
Figura 20 - Capela com reagentes para desparafinização e coloração.....	38
Figura 21 - Corte histológico de brânquia de <i>R. quelen</i> controle.....	41
Figura 22 - Corte histológico de brânquia de <i>R. quelen</i> tratado com <i>P. elliotii</i> em concentração 0,067 g/L.....	42
Figura 23 - Corte histológico de brânquia de <i>R. quelen</i> tratado com <i>P. elliotii</i> na concentração 2,2 g/L.....	43

Figura 24 - Corte histológico de fígado de <i>R. quelen</i> controle.....	44
Figura 25 - Corte histológico de fígado de <i>R. quelen</i> tratado com <i>P. elliottii</i> em concentração 0,067 g/L.....	45
Figura 26 - Corte histológico de fígado de <i>R. quelen</i> tratado com <i>P. elliottii</i> na concentração 2,2 g/L.....	45
Figura 27 - Corte histológico de rim de <i>R. quelen</i> controle.....	46
Figura 28 - Corte histológico de rim de <i>R. quelen</i> tratado com <i>P. elliottii</i> em concentração 0,067 g/L.....	47
Figura 29 - Corte histológico de rim de <i>R. quelen</i> tratado com <i>P. elliottii</i> na concentração 2,2 g/L.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Estimativa da CL-50 de extrato de *P. elliotii* em *R. quelen*.39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivo específico	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Crustáceos, Copépode, <i>Lernaea</i> spp.....	15
3.2 Morfologia e ciclo de vida da <i>Lernaea</i> spp	18
3.3 Diagnóstico e Profilaxia da <i>Lernaea</i> spp	18
3.4 Controle de infestação por <i>Lernaea</i> spp.....	22
3.5 <i>Pinus elliottii</i> (pinus).....	22
3.6 <i>Rhamdia quelen</i> (jundiá).....	24
3.7 Avaliação da toxicidade.....	25
3.8 Histopatologia	27
3.8.1 Brânquias	27
3.8.2 Rins	29
3.8.3 Fígado	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Aquisição dos alevinos de <i>R. quelen</i> e aclimação	33
4.2 Coleta de <i>P. elliottii</i> e preparação dos extratos.....	34
4.3 Desenvolvimento dos ensaios de CL-50	35
4.4 Coleta de amostras para análises laboratoriais.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Ensaio de CL-50	39
5.2 Análises histológicas.....	40
5.2.1 Análise histológica de brânquias	40
5.2.2 Análise histológica de fígado.....	43
5.2.3 Análise histológica de rim.....	45
6 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	49
ICONOGRAFIA	57

1 INTRODUÇÃO

O setor aquícola, importante atividade econômica nacional, vem crescendo de maneira intensiva durante os últimos anos, como informa o Boletim da Pesca e Aquicultura (MPA, 2010), indicando que a aquicultura continental é a atividade com maior intensidade de desenvolvimento, entrando em destaque a piscicultura, que representa 86,6% da produção total nacional no ano de 2011, com valores de 544.490 toneladas (t). A região Sul foi a que mais se destacou, com valores de 153.674,5 t, respondendo por 28,2% da produção nacional continental. O Estado do Paraná situa-se em 1º lugar entre as Unidades da Federação, contribuindo com 73.831,1 t na produção continental (MPA, 2011).

Frente a esse aumento, o consumo de peixe também o acompanha, com acentuada procura, pelo fato de a carne de pescado representar uma valiosa fonte de nutrientes, proporcionando uma alimentação diversificada e saudável. Além de fornecer proteína de alto valor, fornece variedade de micronutrientes essenciais, incluindo várias vitaminas (D, A e B), minerais (cálcio, zinco, iodo, ferro e selênio), ácidos graxos poli-insaturados, Omega-3 (ácido docosa-hexaenóico e ácido eicosapentaenóico), sendo estes escassos em dietas à base de vegetais (FAO, 2012). Embora o consumo médio mundial de peixe per capita seja baixo, o ano de 2010 alcançou o valor de 18,9 quilogramas(kg), com estimativas para 19,2 para o ano de 2012 (FAO, 2012).

Por outro lado, com o grande avanço da produção, a intensificação dos cultivos tem gerado problemas como a má qualidade da água dos cultivos e patologias nos animais, estando relacionadas a grandes prejuízos na produção (KUBITZA, 2011). Sabe-se que o sucesso de um empreendimento de piscicultura depende de vários fatores, e um dos mais importantes é a condição sanitária dos animais, sendo que a ausência de medidas profiláticas, diagnósticos e medidas terapêuticas, poderão causar grande risco e insucesso no empreendimento (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

No município de Laranjeiras do Sul, centro-oeste do estado do Paraná, foi verificado a presença de um crustáceo parasita copépode denominado *Lernaea cyprinacea* (LINNAEUS, 1758) em peixes oriundos de 8 (oito) pisciculturas, e uma das espécies mais acometidas foi o *Rhamdia quelen*, conhecido popularmente por jundiá. O autor indica necessidade e tomadas de decisões para conter a infestação, caso

contrário, poderão ocorrer prejuízos econômicos na piscicultura regional (CARRIEL, 2014).

Embora existam recomendações para tratamento com produtos químicos utilizados na agricultura e pecuária, são poucos os produtos licenciados efetivos no combate ao parasita para o uso em piscicultura. Desta forma, alguns autores vêm recomendando o extrato de acículas de *Pinus elliottii* (pinus) como procedimento terapêutico alternativo no combate à *L. cyprinacea* (REVISTA PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997; CASACA; TOMAZELLI JÚNIOR, 2000; TÓRO et al., 2003), entretanto, ainda não existem estudos que indiquem os possíveis efeitos tóxicos e margens de segurança para o uso deste extrato em diferentes espécies de peixes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi identificar o potencial tóxico e margens de segurança dos extratos de acículas de *P. elliotii* (pinus) nos tratamentos para juvenis da espécie de peixe *R. quelen* (jundiá) submetidos a diferentes concentrações.

2.2 Objetivo específico

- Realizar testes de concentração letal média (concentração para a qual morrem 50% dos indivíduos expostos) - CL-50, em peixes da espécie *R. quelen*, utilizando as concentrações de 0,07, 0,7, 0,8, 1,1, 1,2, 2,2, 3,2, 4,2, 6,7 g/L de extrato de acículas de *P. elliotii*, estimando a sua concentração.

- Avaliar o potencial de toxicidade do extrato de *P. elliotii* através de análises histológicas de brânquia, fígado e rim dos animais sobreviventes ao teste de CL-50.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Crustáceos, Copépode, *Lernaea* spp.

Os crustáceos são invertebrados artrópodes, compostos por várias classes diferentes (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Tratando-se dos crustáceos que parasitam peixes, são organismos altamente modificados, cujos apêndices orais e natatórios foram transformados em potentes órgãos de fixação ao hospedeiro (MONTEIRO, 2011). São principalmente ectoparasitas, fixando-se nos filamentos branquiais, nadadeiras ou tegumento, mas também podem se fixar em músculos e órgãos internos se a situação estiver avançada, resultando em perda de peso, redução da taxa de crescimento e alterações no comportamento. Ocasionalmente causam grandes prejuízos à produção, tanto pela ação direta sobre os peixes, sendo responsáveis por grandes mortalidades, como pela ação indireta, funcionando como vetores de doenças secundárias causadas por bactérias e fungos (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

As espécies de *Lernaea* spp., pertencentes ao Filo Arthropoda, Subfilo Crustacea, Classe Maxillopoda, Subclasse Copépoda, Ordem Cyclopoida e Família Lernaeidae, são crustáceos copépodes parasitas de peixes (BRUSCA; BRUSCA, 2011) e somente os adultos parasitam, pois nos estágios larvais são livres-natantes, até sofrerem metamorfose (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Cerca de 110 espécies que causam lerneoses foram descritas, com 14 gêneros diferentes, e a principal espécie é a *Lernaea cyprinacea* (Figura 1) (HASSAN et al., 2008; GABRIELLI; ORSI, 2000).

Estas espécies foram introduzidas no Brasil juntamente com lotes de carpas húngaras (TÓRO et al., 2003; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008; MONTEIRO, 2011) em meados dos anos 80 (TÓRO et al., 2003), devido a falta de controle sanitário durante o transporte dos peixes (BOEGER; SANTOS-NETO, 1993 apud TÓRO et al., 2003). Estes parasitas vêm se proliferando atingindo principalmente os hospedeiros que possuem potencial para o cultivo e comercialização, pelo fato do aumento dessas atividades mundialmente (MONTEIRO, 2011).

Figura 1 – *Lernaea cyprinacea*, principal causadora da lerneose



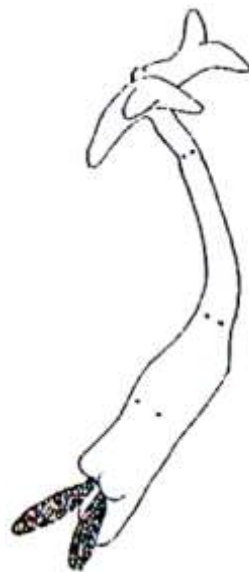
Fonte: CARVALHO, 2016.

Além do Brasil e América do Sul, continentes como América do Norte, Ásia, África e Europa também apresentaram infestações dos cultivos por espécies de *Lernaea* spp. (MARCOGLIASE, 1991), e algumas das espécies de peixes já encontradas parasitadas foram a carpa (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758), matrinxã (*Brycon cephalus*, Günther, 1869), piauçu (*Leporinus macrocephalus*, Garavello; Britski, 1987), curimatá (*Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1847), pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1886), tilápia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758), sorubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Humboldt, 1833), catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) (GABRIELLI; ORSI, 2000), entre outras. As espécies de peixes parasitadas com *Lernaea* spp. nas pisciculturas do município de Laranjeiras do Sul foram jundiá (*Rhamdia* sp.), carpa (*C. carpio*) e piau (*Leporinus* sp.). As espécies tilápia (*O. niloticus*), mandi (*Pimelodus* spp.) e lambari (*Astyanax* spp.) durante as coletas, foram encontradas apenas com ferimentos com suspeita de origem por parasita *Lernaea* spp. (CARRIEL, 2014).

3.2 Morfologia e ciclo de vida da *Lernaea* spp.

A estrutura morfológica da *L. cyprinacea* adulta está disposta em formato corporal alongado, medindo mais de um centímetro de comprimento, e as fêmeas são caracterizadas por possuírem uma região anterior denominada âncora, em forma de chifres “anchorworm”, medindo de 3,7 mm a 13,4 mm de comprimento, formado por 4 ramos, e este é introduzido internamente na epiderme do peixe, formando lesões, resultando em infecções secundárias graves, causados por bactérias, fungos e vírus. A fêmea grávida possui 2 grandes sacos ovíferos visíveis a olho nu, local onde carregam novos indivíduos, podendo ter cerca de 70 ovos, já fecundados, em cada saco (Figura 2) (GABRIELLI; ORSI, 2000; BALDISSEROTTO; NETO, 2004; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

Figura 2 - Fêmea de *L. cyprinacea*

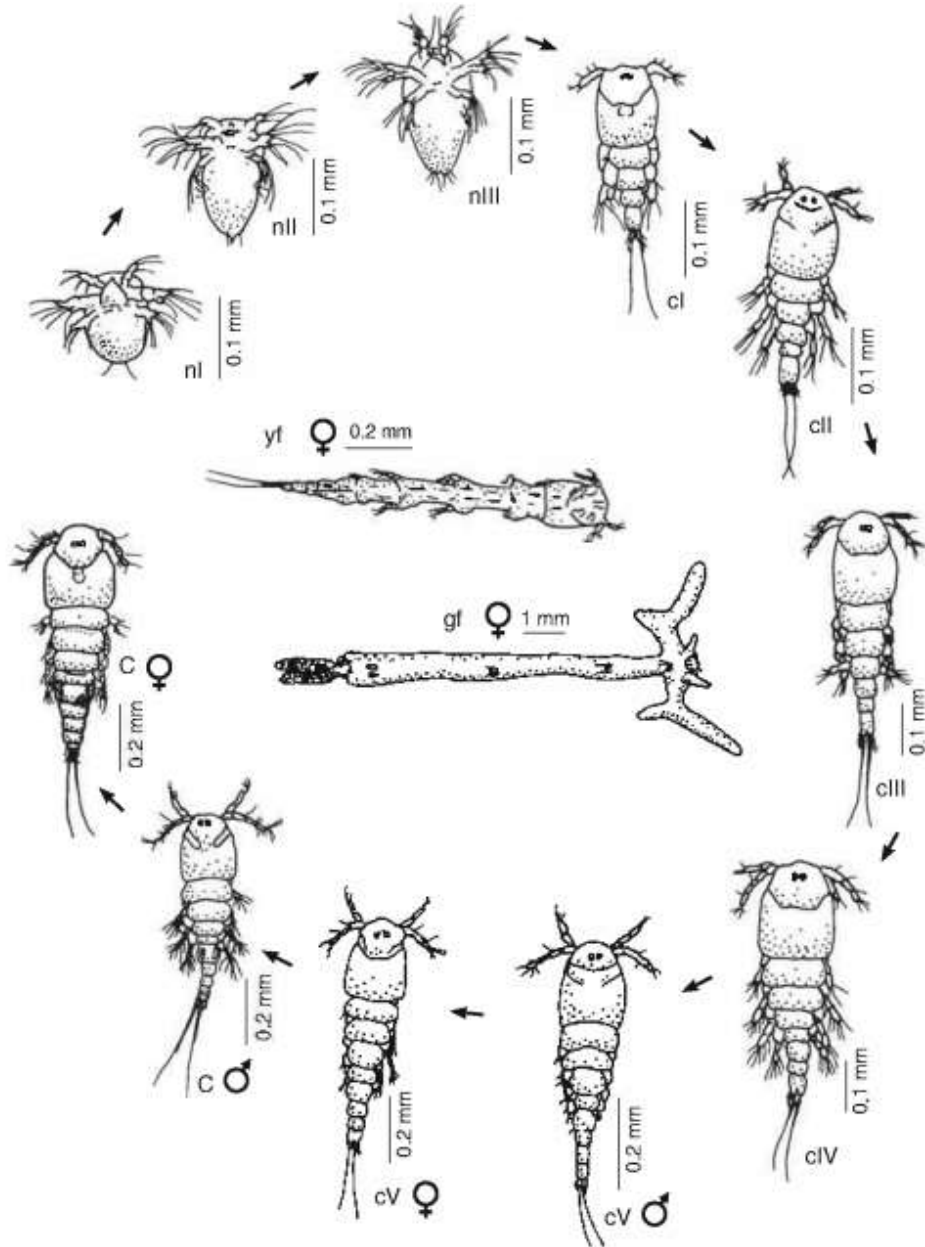


Fonte: PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008.

Possuem ciclo evolutivo complexo, pelo fato de possuírem várias formas larvais (náuplios e copepoditos) (Figura 3). Os ovos dão origem a fase larval denominada náuplio I, que são livres natantes. A sua fecundação acontece na água onde logo em seguida os machos morrem, e as fêmeas sofrem uma metamorfose, assumindo o seu formato característico, dando início as atividades parasitárias, penetrando em novos peixes, parasitando-os e completando o seu ciclo de vida (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). Somente a fêmea desse crustáceo é capaz de parasitar, pois o

macho é de vida livre, além de morrer após realizar a fecundação (GABRIELLI; ORSI, 2000; BALDISSEROTTO; NETO, 2004).

Figura 3 - Ciclo de vida da *L. cyprinacea*.



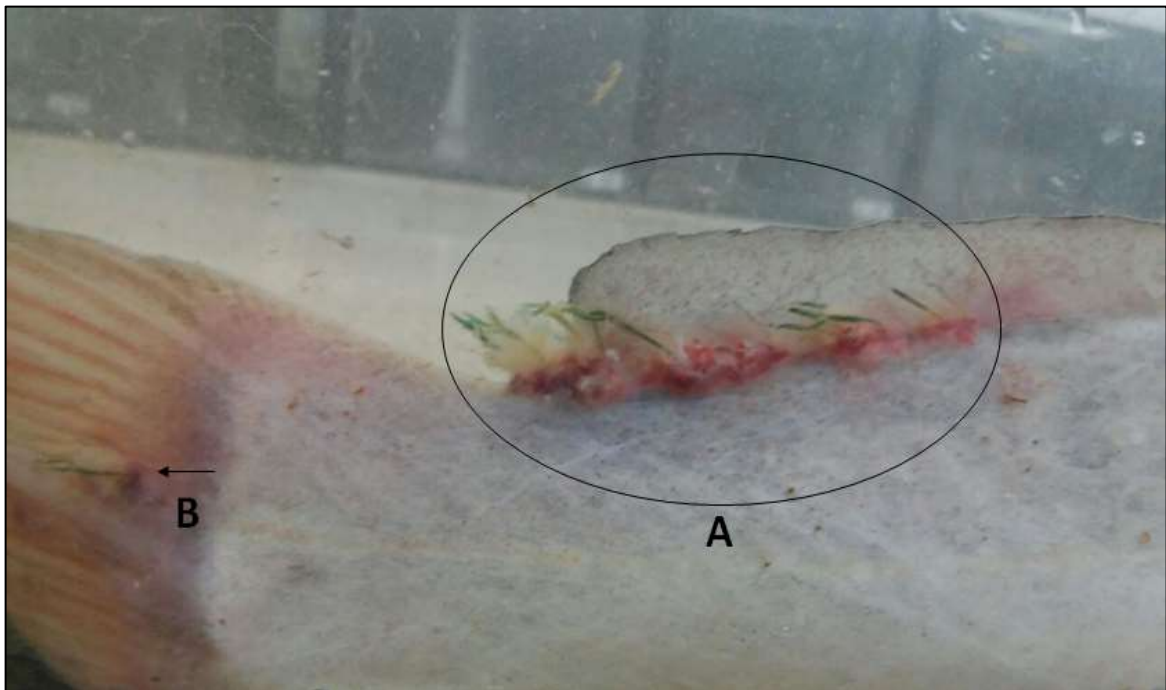
Fonte: AVENANT-OLDEWAGE, 2011.

3.3 Diagnóstico e Profilaxia da *Lernaea* spp.

A lerneose é uma importante enfermidade provocada pelo agente etiológico

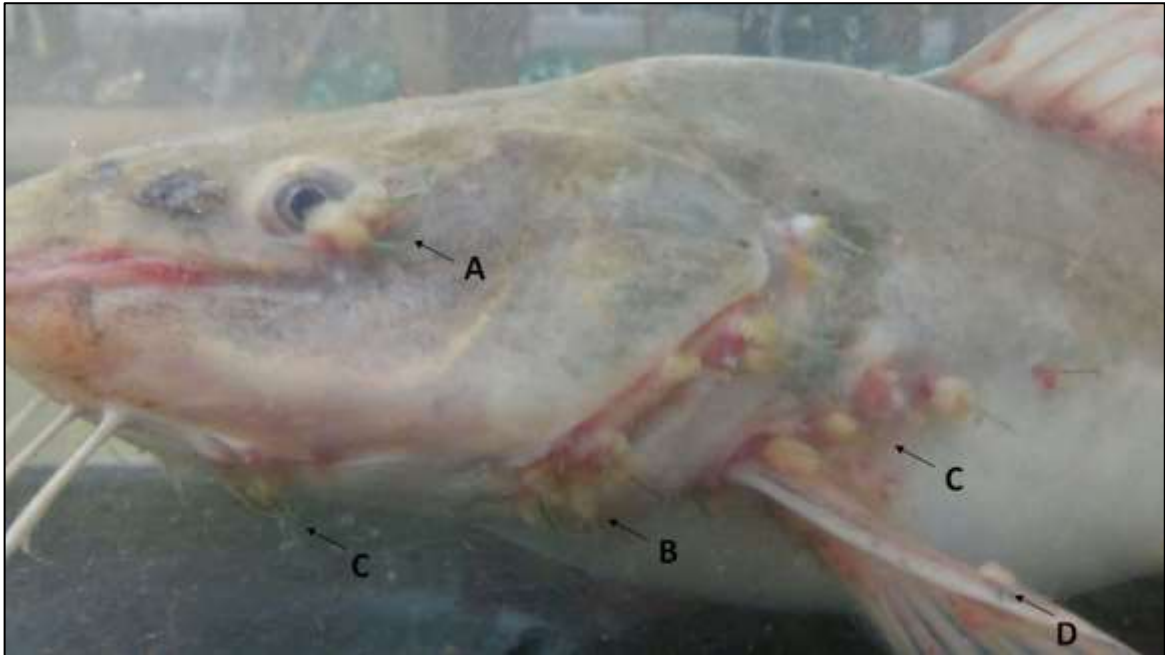
L. cyprinacea. O diagnóstico clínico-epidemiológico dos peixes acometidos se dá a partir de observações visuais, pois os mesmos poderão desenvolver perda de equilíbrio, natação errática e letargia, além de lesões que podem propiciar fortes hemorragias, levando-os a processos anêmicos. Estas hemorragias poderão ser porta de entrada para doenças secundárias com a penetração e instalação de fungos e bactérias, podendo ser fatal ao hospedeiro, que já está debilitado e com o seu sistema de defesa enfraquecido (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). Os peixes parasitados mostram-se apáticos, com anorexia, além de subirem à superfície do viveiro, aglomerando-se nas entradas de água (MONTEIRO, 2011). Também se verifica a presença do parasita adulto fixado na superfície corporal, brânquias ou presença de feridas circulares hemorrágicas (CASACA; TOMAZELLI JÚNIOR, 2000). Podem ser encontrados também em nadadeiras, globo ocular e cavidade bucal, sendo a identificação realizada a olho nu (Figura 4 e 5) (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008). Além de tudo, podem provocar a morte do hospedeiro, fazendo com que a carcaça seja desprezada em uma inspeção veterinária (BALDISSEROTTO; NETO, 2004).

Figura 4 - *L. cyprinacea* inserida em nadadeira dorsal (A) e caudal (B) de *R. quelen*.



Fonte: PEREIRA, 2016.

Figura 5 - *R. quelen* infestado por *L. cyprinacea* em olhos (A), opérculo (B), tegumento (C) e nadadeira peitoral (D).



Fonte: PEREIRA, 2016.

A profilaxia consiste em não introduzir indivíduos parasitados nas pisciculturas e em controlar a qualidade da água, pois esta pode conter formas larvais de *Lernaea* spp. Sempre que se adquirem novos lotes de peixes, devem-se aplicar banhos profiláticos e realizar a prática da quarentena. Os produtos utilizados na profilaxia (banhos e quarentena) têm ação principalmente sobre as formas larvais, que é a fase em que o parasita ainda não se encontra fixado ao peixe (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

3.4 Controle de infestação por *Lernaea* spp.

Algumas medidas profiláticas e terapêuticas citadas por diferentes autores, visando o combate ao parasita, são descritas a seguir: 1) banho em cloreto de sódio em diferentes concentrações ou períodos de tratamento (AL-HAMED; HERMIZ, 1973; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008; KUBITZA, 2011; MONTEIRO, 2011); 2) tratamento com formalina (AL-HAMED; HERMIZ, 1973; BALDISSEROTTO; NETO, 2004; MONTEIRO, 2011); 3) Dipterex (AL-HAMED; HERMIZ, 1973; BALDISSEROTTO; NETO, 2004); 4) Metrifonato (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO,

2008; MONTEIRO, 2011); 5) verde malaquita (AL-HAMED; HERMIZ, 1973; MONTEIRO, 2011); 6) Triclorfon (KUBITZA, 2011); 7) Permanganato de potássio (BALDISSEROTTO; NETO, 2004; MONTEIRO, 2011); 8) Odiflubenzuron (Dimilin®) (KUBITZA, 2011). Embora sejam identificadas recomendações para tratamentos com produtos químicos utilizados na agricultura e pecuária, há apenas um produto licenciado para uso em piscicultura, o Masoten®, da empresa Bayer, cujo princípio ativo é o Organofosforado Triclorfon (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2015; AQUA CULTURA, 2015).

No Brasil, existem poucos estudos na tentativa de testar a eficácia e os efeitos secundários de fármacos utilizados para combater parasitoses em peixes. Sem a comprovação científica de sua eficácia, não é possível prever a extensão do prejuízo e em muitos casos parece ser melhor sacrificar o plantel, drenar e desinfetar o tanque e, a seguir, recomeçar a criação (MONTEIRO, 2011).

Como citado anteriormente, alguns autores vêm utilizando produtos químicos na tentativa de combater este parasita, porém são produtos comprometedores à saúde pública e ao meio ambiente (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997), ou muitas vezes, não se tem a real certeza da eficiência do tratamento. Sendo assim, como medida alternativa à utilização de produtos químicos, o uso de *Pinus* sp. para o tratamento de lerneoses foi recomendado pela Revista Panorama da Aquicultura (1997) e sua eficiência foi estudada por Casaca e Tomazelli Júnior (2000) e Tóro et al. (2003).

A Revista Panorama da Aquicultura (1997), apresentou artigo utilizando o extrato de acículas (falsas folhas) de *Pinus* sp. como princípio ativo para procedimento terapêutico contra a *Lernaea* sp. na dosagem de 8 kg/400 m³. As recomendações foram as seguintes: 4 (quatro) aplicações do extrato relacionado com a temperatura. Em 25 °C, aplicações a cada 9 (nove) dias; em 30 °C, aplicações a cada 7 (sete) dias; em 35 °C, aplicações a cada 5 (cinco) dias.

Casaca e Tomazelli Júnior (2000) descreveram a metodologia que obteve melhor eficiência em seus experimentos, onde, independentemente do tamanho e espécie do hospedeiro, grau de infestação, taxa de estocagem nos viveiros, período de cultivo ou época do ano, foi recomendado o mesmo tratamento. O autor aplicou a solução de extrato de *Pinus* sp. para 1 hectare de área alagada (correspondente a 10.000 m²), triturando, em máquina forrageira, 150 kg de acículas verdes, e mantendo em 200 L de água por período de 24 a 48 horas. Após este intervalo de tempo, a

solução e acículas maceradas foram espalhadas por toda a superfície do viveiro. Este tratamento foi repetido por 4 (quatro) vezes com intervalo de 5 (cinco) dias. A partir da terceira aplicação, o autor identificou que os parasitas adultos estavam mortos, e as lesões dos peixes em processo de cicatrização.

Tóro et al. (2003) durante a execução de seu experimento, avaliou a atividade de constituintes de resina de *P. elliotii*, analisando o efeito da resina pura, de duas frações, uma extraída do vapor de óleo e outra extraída em clorofórmio, assim como de seus compostos majoritários, α e β -pineno, em concentrações que variaram de 0,5 a 10 mg/L, no controle do parasita *L. cyprinacea*. O autor comprova a eficiência das diferentes formas de tratamento nas concentrações testadas, porém os constituintes puros apresentaram menor eficiência. Outro teste realizado pelo autor foi de toxicidade aguda (CL-50), ou seja, dose letal em 50% dos peixes da espécie *Leporinus* sp., utilizando a resina bruta, sendo encontrada concentração de 200 mg/L, muito superior a dose efetiva no combate ao parasita, demonstrando segurança de realização deste tratamento.

Em palestra, Casagrande (2014) mencionou que, em um tratamento para um lote de *Rhamdia* sp. infestados com *Lernaea* sp. utilizando extrato de acículas de *Pinus* sp. ocorreu a morte de todos os animais tratados, entretanto, não mencionando a dosagem utilizada durante o tratamento.

3.5 *Pinus elliotii* (pinus)

O *Pinus* spp. são espécies arbóreas que ocorrem naturalmente no Sul e Sudeste dos Estados Unidos, amplamente plantado para a produção de madeira destinada ao processo mecânico, bem como a produção de celulose, papel, extração de resina, fabricação de medicamentos, perfumes, plásticos, óleo combustível, entre outros (SHIMIZU; SPIR, 1999). Exótico no Brasil, a variedade mais utilizada é o *P. elliotii* (Figura 6), indicada para o plantio nas regiões Sul e Sudeste. A produção brasileira de resina teve início no final dos anos 1970, tornando-se o maior produtor na América do Sul. Atualmente o Brasil é o segundo país exportador de goma-resina, com uma produção em torno de 106.366 t por ano. Existem diversos gêneros de pinus conhecidos mundialmente, e o subproduto resultante de seus processos metabólicos, a resina, difere de cada uma das espécies (SHIMIZU; SPIR, 1999). Sua resina é rica

em compostos fenólicos, terpenóides (TÓRO et al., 2003), terebintina (fração volátil) e rosina (fração não-volátil). A terebintina pode ser fracionada para gerar seus constituintes majoritários (α e β -pineno) (RODRIGUES, 2008).

Figura 6 - Exemplar de *P. elliotii* (pinus).



Fonte: CARVALHO, 2016.

Atualmente, o pinus vem sendo utilizado no tratamento alternativo a produtos químicos, utilizando suas acículas (falsas folhas) (Figura 7) no combate ao parasita de peixes *Lernaea* sp. (REVISTA PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997; CASACA; TOMAZELLI JÚNIOR, 2000; TÓRO et al., 2003).

Figura 7 - Acículas de *P. elliotii*.

Fonte: CARVALHO, 2016.

3.6 *Rhamdia quelen* (jundiá)

Uma das espécies de peixes nativa do Brasil susceptível e acometida pelo agente etiológico *L. cyprinacea* é o *R. quelen* (jundiá) (Figura 8), entre outras espécies, fato este verificado durante coletas em pisciculturas com finalidade comercial do município de Laranjeiras do Sul – PR (CARRIEL, 2014). O interesse pelo cultivo de *R. quelen* vem crescendo no decorrer dos últimos anos por pesquisadores e produtores, devido a sua adaptação ao clima do Sul do Brasil, além de ser de fácil indução à desova, aceitar alimento exógeno e artificial, e estar entre as espécies de peixes que mais possuem teores de proteína em sua carne (em torno de 17%), sendo estas características favoráveis para a criação comercial (GOMES et al., 2000; BALDISSEROTTO; NETO, 2004).

O seu cultivo no país alcançou, no ano de 2011, o valor de 1.747,3 t, estando entre as 18 espécies mais cultivadas de águas interiores (MPA, 2011). *R. quelen* é um peixe de couro, de coloração acinzentada, com a parte ventral do corpo mais clara, e o seu crescimento é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida (BALDISSEROTTO; NETO, 2004).

Figura 8 - Exemplar de *R. quelen* (jundiá).



Fonte: TIMM, 2009.

Contudo, o parasita *Lernaea* spp. vem causando sérios problemas em cultivos de *Rhamdia* sp. pois, penetram a sua cabeça com formato de âncora na epiderme do peixe, instalando-se, crescendo e desenvolvendo-se, deixando o animal debilitado e abrindo portas de entrada para doenças secundárias a partir de bactérias e fungos oportunistas (BALDISSEROTTO; NETO, 2004). Perante a este problema, a falta de produtos licenciados para uso em piscicultura no combate a doenças e a recomendação de uso de *Pinus* sp. no combate a *Lernaea* spp., utilizou-se esta espécie para desenvolver experimentos relativos ao efeito tóxico agudo do extrato de acículas de *P. elliottii* da espécie *R. quelen*, realizando testes de avaliação de toxicidade para o uso deste extrato, visando posterior combate à infestação, com finalidade de evitar prejuízos econômicos na piscicultura regional.

3.7 Avaliação da toxicidade

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações entre as substâncias químicas e o organismo, e tem por finalidade prevenir,

diagnosticar e tratar intoxicações. Os testes de toxicidade aguda, baseados no grau de letalidade média do composto são amplamente utilizados para identificação e comparação de toxicidade entre produtos, sejam para demonstração de segurança de medicamentos (FARIAS, et al., 2012; ANVISA, 2013), toxicidade de agrotóxicos (MOURA, 2009; SOUZA, 2014; ANVISA, 2015) ou toxicidade de produtos químicos de uma forma geral (SPRAGUE, 1969; WAYNON, 1980; COSTA et al., 2008).

Os testes de toxicidade aguda em peixes, com duração de 24 a 96 horas são preconizados por Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (1992), devendo, quando possível, ser expresso como Concentração Letal Média (CL-50), ou seja, concentração da substância em teste, que mata 50% dos animais no período de teste, sendo que a estimativa da CL-50 deve ser feita, preferencialmente, por teste Probit, com limites de confiabilidade de 95% (USEPA, 2011). Quando não for possível o uso do Probit, por exemplo, quando não há concentrações testadas com letalidade parcial, a estimativa poderá ser realizada por média entre a maior dose que não causa letalidade e a menor dose que causa 100% de mortalidade.

Sobre o uso de medicamentos fitoterápicos para o uso veterinário, não existe legislação específica, entretanto a resolução N° 26, DE 13 DE MAIO DE 2014, da ANVISA, dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (ANVISA, 2014). Segundo esta resolução, a segurança e a eficácia dos medicamentos fitoterápicos devem ser comprovadas, entre outras, por ensaios não clínicos e clínicos de segurança e eficácia seguindo, como parâmetro mínimo, a última versão do Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, da ANVISA. Este documento propõe que métodos alternativos para a estimativa da dose letal, envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD (1992), possam ser utilizados (ANVISA, 2013).

Sobre a utilização do *Pinus* sp., não são encontrados estudos aprofundados sobre o seu efeito tóxico em animais, entretanto, Potgieter et al. (1995) demonstraram que o extrato de serragem de pinus em acetona apresenta grande toxicidade através de ensaio de CL-50 e indução de enzimas do sistema P450 em células de hepatoma de rato, linhagem Hepa-1. Tóro et al. (2003) também demonstrou resultados de teste de toxicidade aguda (CL-50) utilizando resina bruta de *Pinus* sp. para *Leporinus* sp., encontrando em 48 horas a concentração de 0,2 g/L, sendo esta uma dosagem

superior a dose efetiva no combate ao parasita, demonstrando segurança na realização do tratamento.

3.8 Histopatologia

Além dos testes de letalidade média, o efeito do ambiente sobre parâmetros bioquímicos e fisiológicos de um organismo pode ser estudado através da identificação de alterações morfológicas celulares e ultracelulares (MEYER et al., 1998), auxiliando na identificação de órgãos que apresentam maior suscetibilidade a substâncias tóxicas. Os órgãos utilizados para esta análise foram brânquia, fígado e rins, por atuarem como órgãos de entrada, metabolização e saída, respectivamente.

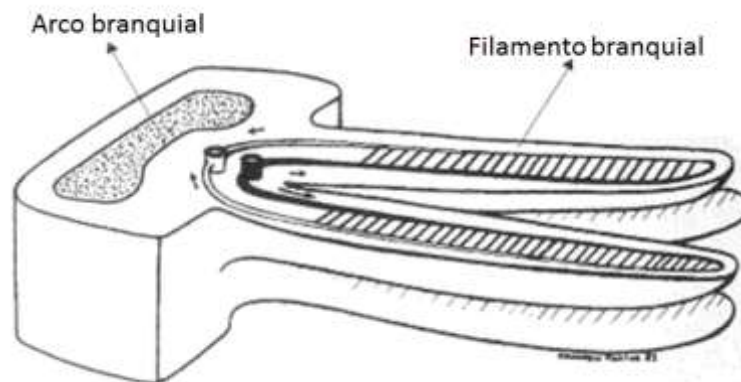
3.8.1 Brânquias

A respiração dos peixes ocorre através das brânquias, que são estruturas de cor avermelhada localizada na cabeça. A água entra pela boca, passa através das brânquias, onde ocorre a passagem do oxigênio da água para o sangue que circula dentro dos filamentos das brânquias, e depois sai pelos opérculos (BALDISSEROTTO; NETO, 2004). As brânquias são divididas em quatro arcos branquiais de cada lado da faringe. Estes são formados por duas fileiras de filamentos branquiais, que são formados por lamelas branquiais (BALDISSEROTTO, 2013).

Os arcos branquiais são como filtros que evitam a passagem de alimentos, detritos e outros materiais sólidos pelas fendas e filamentos branquiais. Cada brânquia constitui um semi-ramo, e este consiste de filamentos em ambos os lados, cranial e caudal, de uma fenda branquial (Figura 9). Filamentos branquiais são comparados ao formato de um leque, e são sustentados internamente por elementos cartilagosos ou ósseos, situados em sua margem ou por um único elemento situado centralmente, chamado de septo branquial. Músculos branquiais inserem-se nesses suportes para adução e abdução dos filamentos. A partir do filamento branquial, surgem evaginações formando placas laterais que são as lamelas branquiais, sendo estas a parte funcional das brânquias (Figura 10) (GEORGE; CASTRO, 1998). Além disso, nos filamentos podem ser encontradas fibras nervosas, células mucosas, células

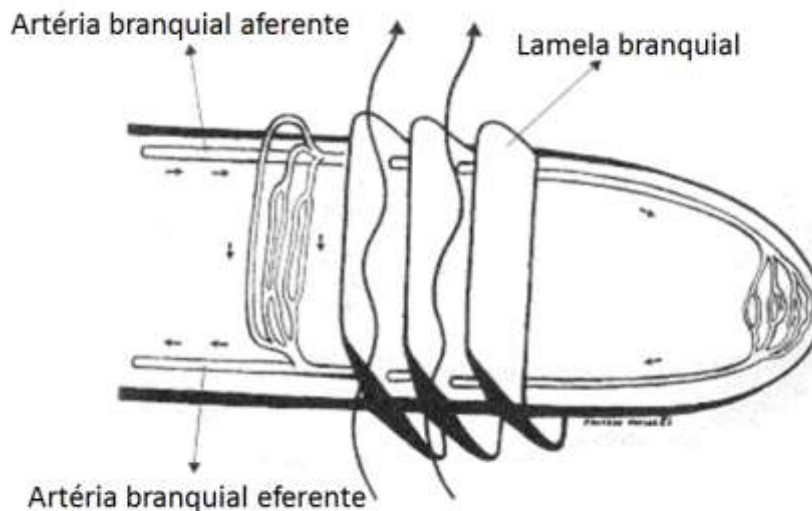
neuroepiteliais, células de cloreto, células não diferenciadas e células pavimentosas, cada uma desenvolvendo a sua função específica. Por exemplo, as células mucosas têm função de produzir um muco parecendo proteger contra danos físicos, substâncias tóxicas e patógenos presentes na água, e se os peixes ficam estressados, essa secreção tende a aumentar (BALDISSEROTTO, 2013).

Figura 9 - Esquema de um arco branquial com filamentos e lamelas (hachurado). As setas indicam o seu fluxo sanguíneo.



Fonte: GEORGE; CASTRO, 1998.

Figura 10 - Esquema de um filamento branquial com três lamelas. As setas sinuosas indicam a direção do fluxo da água, e as pequenas, a direção da corrente sanguínea.



Fonte: GEORGE; CASTRO, 1998.

As lamelas branquiais são formadas por células pilares, e cobertas por uma membrana basal e o epitélio, que vem em continuidade com os filamentos branquiais, e é constituído por uma camada interna de células não diferenciadas e uma externa de células pavimentosas. A circulação do sangue dentro das lamelas se faz em um

sentido, e a circulação da água por fora da lamela se faz em sentido contrário, formando um sistema contracorrente. A medida que o sangue vai entrando nas lamelas e circulando nos espaços existentes entre as células pilares, vai recebendo mais oxigênio por difusão da água que está passando entre as lamelas (BALDISSEROTTO, 2013). Além dessas células presentes nas lamelas, há células calciformes e acidófilas, com função de remoção de cloretos do sangue contra um gradiente de concentração, atuando na osmorregulação. O número de lamelas branquiais varia consideravelmente, mas está correlacionado diretamente às atividades das espécies: quanto mais ativo o peixe, maior será a população de lamelas (GEORGE; CASTRO, 1998).

3.8.2 Rins

O rim é um órgão par, de cor vermelho-escura, que faz parte do sistema urinário (Figura 11), e tem como função a excreção de metabólitos produzidos (BALDISSEROTTO; NETO, 2004) e a conservação de materiais do organismo para que se mantenha a saúde em bom estado. Ele retira urina do corpo e subprodutos tóxicos do sangue, e conserva sais, glicose, proteínas, água, entre outros materiais importantes. Ajuda regular a pressão do sangue, a hemodinâmica e o equilíbrio ácido-base do corpo (GARTNER; HIATT, 2003).

O parênquima renal é formado por dois elementos principais, os néfrons e os túbulos coletores. O néfron constitui a unidade funcional mais elementar do rim, sendo formado por vários segmentos morfológicamente distintos. A extremidade inicial do néfron é formada por uma dilatação, o corpúsculo renal contendo o glomérulo que é especializado em realizar a filtração do sangue. A partir daí, o néfron é tubular, consistindo de túbulos contorcidos, sendo contínuo com o túbulo coletor (GEORGE; CASTRO, 1998). Os rins de teleósteos de água doce contêm glomérulos bem desenvolvidos, e túbulos proximais e distais. Os túbulos proximais apresentam duas subunidades. A primeira (segmento I) é homóloga ao túbulo proximal de vertebrados tetrápodes, e a segunda (segmento II) é verificada apenas em peixes.

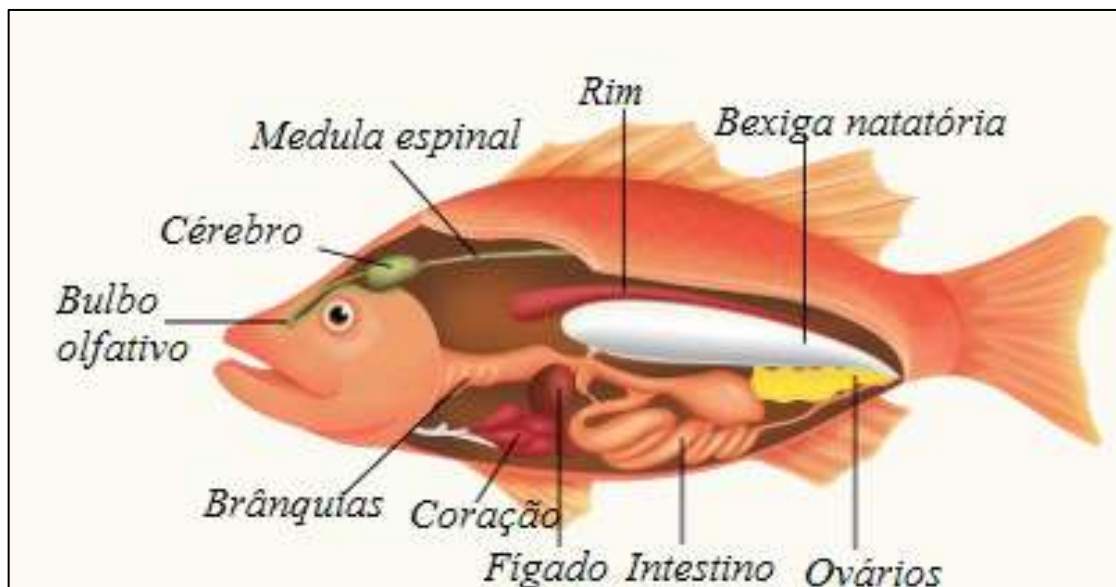
Os rins dos peixes estão envolvidos principalmente na excreção de íons e na osmoregulação. Os rins desses animais pouco contribuem para a excreção de

resíduos nitrogenados, deixando esta função a serem secretadas pelas brânquias (THRALL, 2006).

Nos peixes, néfrons estão mergulhados em tecidos hematopoiéticos, sendo esta uma porção mais escura. É neste local que serão produzidos os elementos do sangue, como células vermelhas, células de defesa e trombócitos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

A atividade urinária se dá na porção caudal dos rins. Em razão do alto volume de água doce, e da perda de sal, os peixes ósseos de água doce mantêm altas taxas de filtração glomerular (TFG) e de produção urinária, a fim de contrabalancear a elevada absorção osmótica de água, visto que conservam o teor de cloreto de sódio (NaCl) devido a sua reabsorção nos túbulos renais e nos ductos coletores. O processamento final da urina ocorre na bexiga impermeável à água, na qual a reabsorção de íons é fundamental (THRALL, 2006).

Figura 11. Localização do rim em peixe.



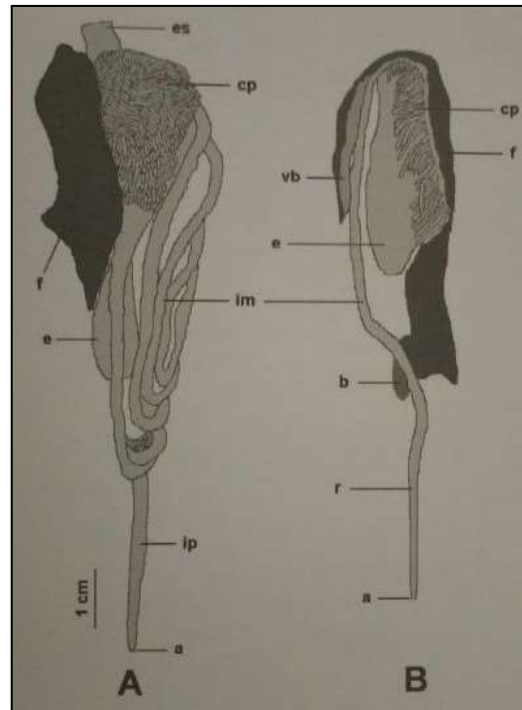
Fonte: <http://alunosonline.uol.com.br/biologia/peixes.html>.

3.8.3 Fígado

O fígado, ou hepatopâncreas nos peixes, localizado na cavidade abdominal e pertencente ao sistema digestório (Figura 12), apresenta, geralmente, uma cor

vermelho-escura. Armazena parte dos nutrientes absorvidos pelo organismo, além de produzir a bile, que é um líquido esverdeado que emulsifica gorduras, aumentando a área de atuação das enzimas presentes no intestino (BALDISSEROTTO; NETO, 2004). É considerado como a maior glândula do organismo, e a sua unidade morfofuncional é o lóbulo hepático, que se agrupa formando lobos. Cada lóbulo hepático é representado por um parênquima de células hepáticas (os hepatócitos) e um estroma conjuntivo-vascular. Os hepatócitos são células com núcleos grandes e citoplasma acidófilo, estando dispostos em placa orientadas radialmente e constituídas por única camada de células, semelhantes a um muro de tijolos. As placas de células hepáticas são separadas uma das outras por capilares sinusóides, que são ricos em células fagocitárias, e que circula o sangue entre os hepatócitos. Nos capilares sinusóides desembocam ramos terminais da artéria hepática e da veia porta, de tal modo que há uma mistura de sangue arterial e venoso que fluem para o centro do lóbulo onde se localiza a veia centrolobular que coleta o sangue dos sinusóides. Os diversos lóbulos hepáticos estão delimitados por tecido conjuntivo. As regiões ricas em tecido conjuntivo e que se localizam nos cantos dos lóbulos chama-se espaços portas, ocupados por uma arteríola (ramo da artéria hepática), uma vênula (ramo da veia porta), um dúctobilífero e linfáticos (GEORGE; CASTRO, 1998). Os peixes não apresentam delimitação nítida dos lóbulos hepáticos.

Figura 12 - Sistema digestório de peixe mostrando a localização do fígado.



Fonte: MENIN; MIMURA, 1993 apud BALDISSEROTTO, 2013.

A figura 12 apresenta (A) *Prochilodus affinis* e (B) *Hoplias malabaricus*, ambos em vista lateral. Legenda: a: ânus, b: baço, e: estômago, es: esôfago, cp: cecos pilóricos, f: fígado, im: intestino médio, ip: intestino posterior, r: reto, vb: vesícula biliar.

As principais funções do fígado são: produção de bile, armazenamento de glicogênio, armazenamento de lipídios, síntese de proteínas (fibrinogênio, protrombina, albumina), armazenamento de vitaminas (A, D, B12, K), metabolização de drogas, etc., todas elas realizadas ao nível dos hepatócitos. A bile produzida nos hepatócitos é armazenada na vesícula biliar (GEORGE; CASTRO, 1998).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos realizados com *R. quelen* neste trabalho foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal da Fronteira Sul, com protocolo 23205.004132/2015-02.

Durante a execução do presente trabalho, foram realizadas tarefas de coleta de *P. elliottii* e preparação dos extratos das acículas, aquisição de juvenis de *R. quelen* e aclimação, desenvolvimento dos ensaios de CL-50, coleta das amostras dos órgãos brânquias, fígado e rins e posterior análises laboratoriais.

4.1 Aquisição dos alevinos de *R. quelen* e aclimação

Os juvenis de *R. quelen* pesando 3 gramas foram adquiridos em empresa de produção de alevinos e transportados até o laboratório de Patologia do *Campus* da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Laranjeiras do Sul (PR). Os animais foram separados em 15 grupos de 12 indivíduos, aclimatados em aquários de 30 litros por 7 dias (Figura 13). A aclimação foi realizada em temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido acima de 5 mg/L, amônia abaixo de 0,1 mg/L de NH_3 , pH $7,0 \pm 0,5$ (BALDISSEROTTO; NETO, 2004), monitorados diariamente, utilizando sonda multi-parâmetro. A temperatura foi mantida com aquecedor acoplado a termostato, e o oxigênio por bomba de aeração constante. Alterações da qualidade da água em relação à amônia e pH foram corrigidos com troca parcial da água dos aquários. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial extrusada até a “saciedade aparente”. Os aquários foram sifonados após 20 minutos, para a retirada de sobras de rações e resíduos do fundo dos aquários.

Figura 13 – Aclimação dos juvenis de *R. quelen*.



Fonte: ROMÃO, 2015.

4.2 Coleta de *P. Elliottii* e preparação dos extratos

Foram coletadas acículas de *P. Elliottii* em torno do *Campus* da UFFS, e a preparação das soluções dos extratos (Figura 14) foram realizadas no Laboratório de Patologia. Para o preparo dos extratos, foi seguido a metodologia baseada nas recomendações de Casaca e Tomazelli Júnior (2000), porém, com algumas modificações, sendo da seguinte maneira: pesou-se as acículas (Figura 15), e estas foram deixadas imersas em 200 mL de água por 24 horas. Após esse período, os extratos totais (com as acículas maceradas) foram adicionados aos aquários de 30 litros cada. Um aquário foi mantido sem tratamento, como controle do experimento.

Figura 14 – Acículas de *P. Elliottii* sendo maceradas e pesadas.



Fonte: NASCIMENTO, 2015.

Figura 15 – Acículas de *P. Elliottii* prontas para serem imersas em água.



Fonte: AMARAL, 2015.

4.3 Desenvolvimento dos ensaios de CL-50

Os aquários com os animais aclimatados foram separados em 9 grupos experimentais e 3 controles. Os grupos experimentais foram tratados com concentrações de 0,07, 0,7, 0,8, 1,1, 1,2, 2,2, 3,2, 4,2, 6,7 g/L de extrato bruto de *P. elliottii*. Após a aplicação dos extratos, foram realizados acompanhamentos dos aquários em intervalos de 6 horas, para identificação de números de mortos (Figura 16), durante um período de 24 horas. O número de mortes acumuladas por aquário, foram utilizadas para estimativa da CL-50. O cálculo de CL-50 foi realizado através de estimativa estatística utilizando sistema Probit. Os animais sobreviventes dos diferentes grupos experimentais e controles foram eutanasiados e coletados os tecidos de brânquia, rim e fígado, para posterior análise histológica para possível identificação de efeitos tóxicos do extrato do *P. elliottii*. Durante o período do tratamento, os animais não foram alimentados e não foi realizada nenhuma interferência no aquário.

Figura 16 – Juvenis de *R. quelen* submetidos ao teste da CL-50 com *P. elliottii*.



Fonte: ROMÃO, 2015.

4.4 Coleta de amostras para análises laboratoriais

Os animais foram anestesiados com eugenol (em concentração de 100 mg/L) para em seguida serem eutanasiados com aprofundamento da anestesia. Foi realizada coleta de brânquias, fígado e rins (Figura 17), os quais foram fixados em formalina 10% por 24 horas e transferidos para o álcool 70% até o início do procedimento histológico de rotina.

Figura 17 – Equipe de trabalho realizando coleta de brânquias, fígado e rins.

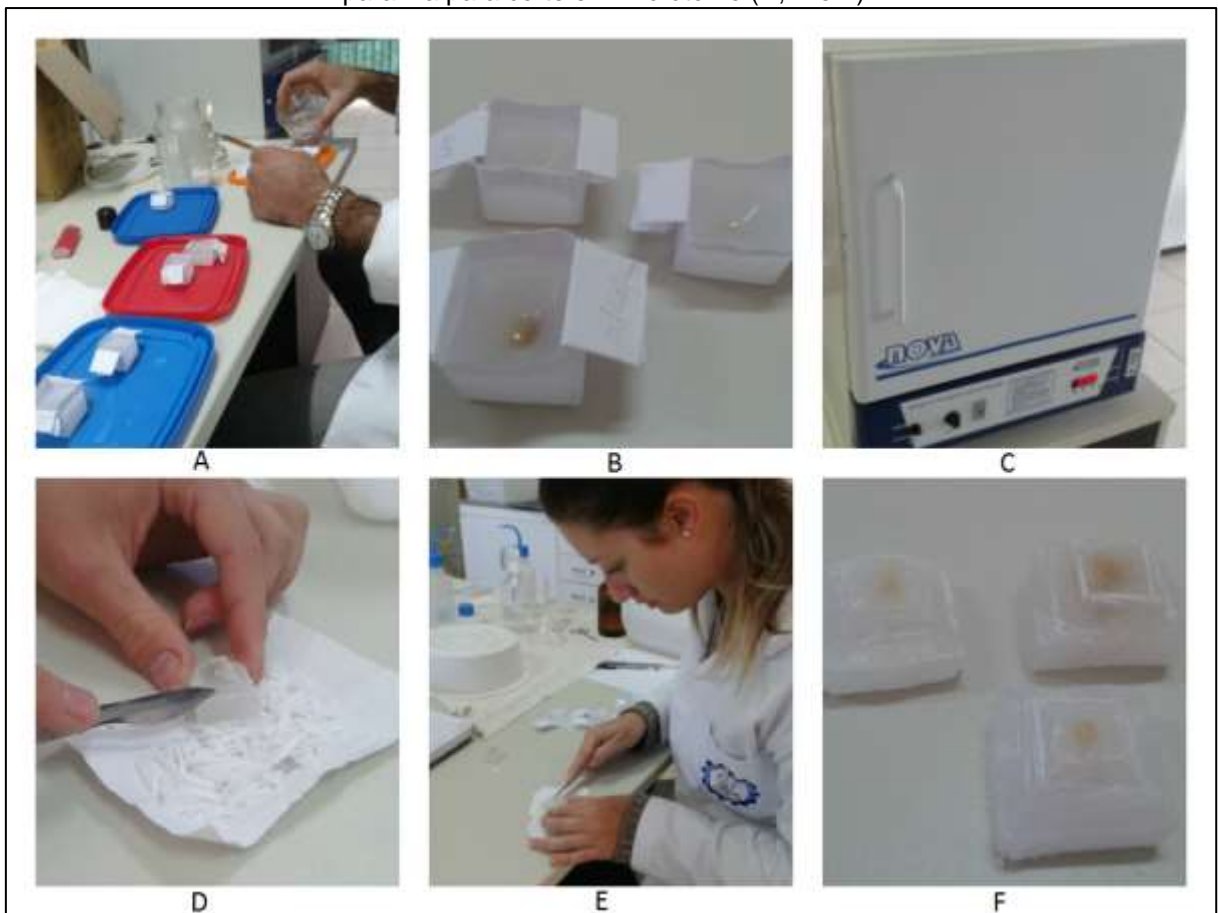


Fonte: PASSARIN, 2016.

4.5 Procedimento histológico

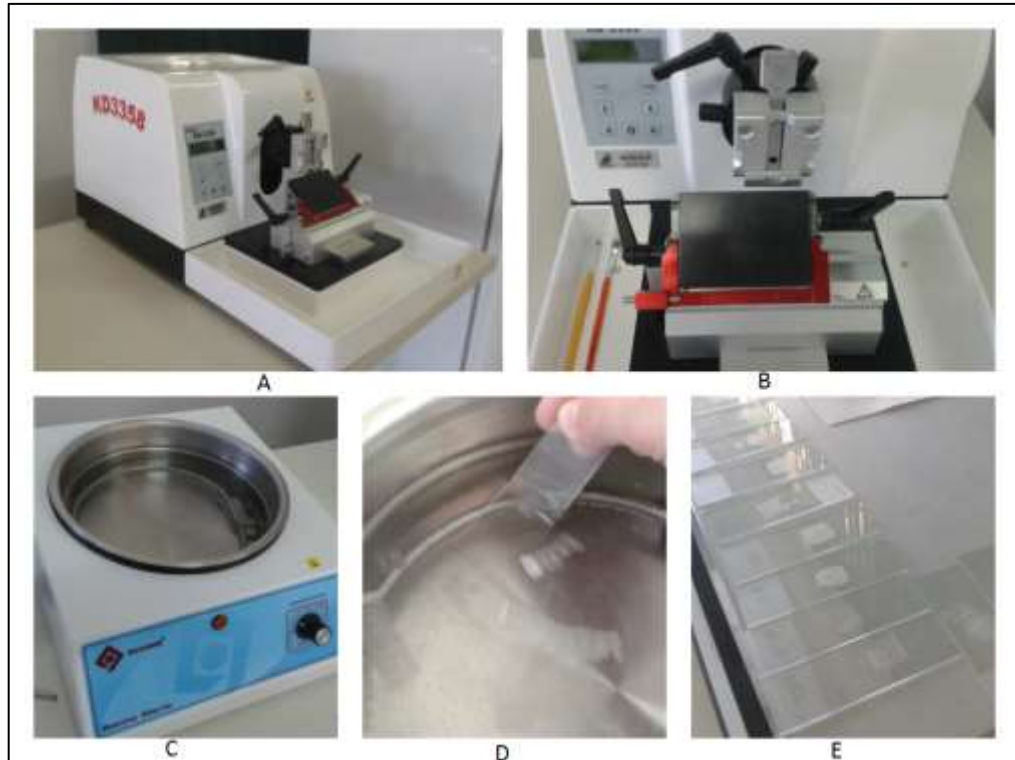
O processamento histológico de rotina, o qual tem por objetivo estudar as características, propriedades e funções morfofisiológicas dos tecidos que constituem os seres vivos, foi realizado a partir de sequências de técnicas específicas, seguindo algumas etapas como a desidratação dos órgãos através de série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina (Figura 18) (BEÇAK; PAULETE, 1976). Após esta etapa, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo do modelo Minnot (Figura 19), posteriormente desparafinizados com xilol e hidratados com série alcóolica decrescente e corados pela ação combinada de Hematoxilina de Harris e Eosina para descrição da morfologia (Figura 20) (HOROBIN; BANCROFT, 1998; SABOTTA; WELSCH, 2002). As lâminas foram analisadas por visão microscópica e a documentação fotográfica realizada em microscópio fotográfico.

Figura 18 - Inclusão em parafina (A e B); estufa utilizada para séries de parafina (C); preparo da parafina para corte em micrótomo (D, E e F).



Fonte: CARVALHO, 2016.

Figura 19 – Micrótomo (A e B); “banho Maria” para esticar o corte (C e D); lâminas secando em chapa quente (E).



Fonte: CARVALHO, 2016.

Figura 20 - Capela com reagentes para desparafinação e coloração (A e B); lavagem com água corrente após séries alcólicas (C); corantes Hematoxilina de Harris e Eosina (D); montagem de lâmina permanente com resina para colagem da lamínula (E).



Fonte: CARVALHO, 2016.

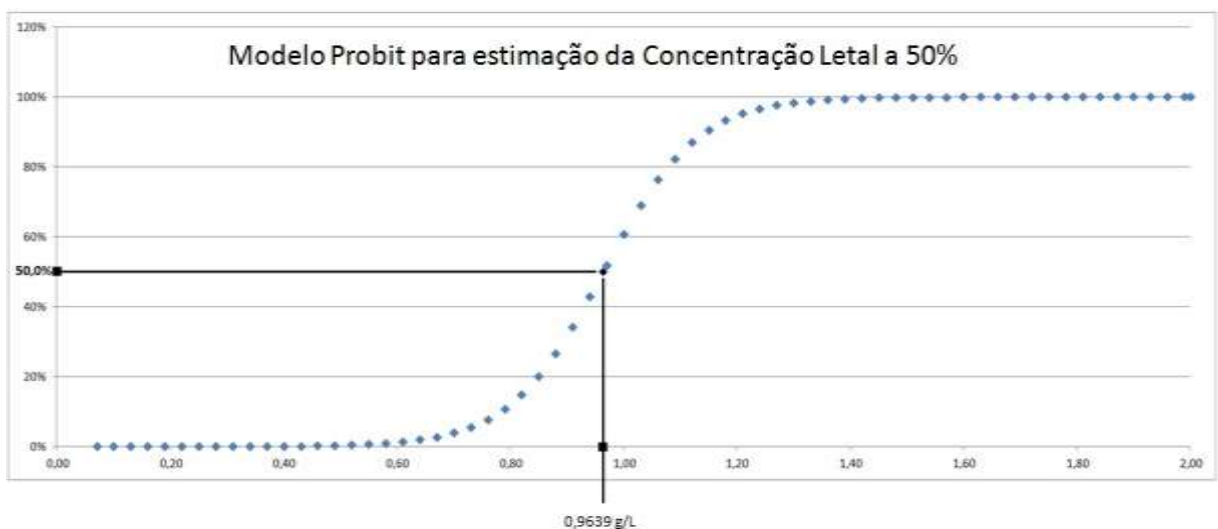
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com essa pesquisa, pretendeu-se identificar o potencial tóxico e margens de segurança dos extratos das acículas de *P. elliotii* (pinus) nos tratamentos para juvenis de *R. quelen* (jundiá), uma das espécies de peixes mais acometidos pelo parasita *L. cyprinacea* na região de Laranjeiras do Sul. Para isso, foi realizado teste de concentração letal média (CL-50), para a exposição do *R. quelen* ao extrato bruto, identificando as concentrações seguras. Posteriormente, foram realizadas análises histológicas de brânquias, fígado e rins dos animais sobreviventes ao teste, verificando possíveis alterações morfológicas ocorridas nos tecidos, provenientes do teste.

5.1 Ensaio de CL-50

Nos ensaios de CL-50, visando a identificação do potencial tóxico e margens de segurança do extrato bruto de *P. elliotii* a ser aplicado em *R. quelen*, a partir do número de mortes avaliadas nas diferentes concentrações testadas, a CL-50 foi estimada em 0,963 g/L, com intervalos de confiança de 0,802 g/L e 1,125 g/L, como informa o gráfico 1, sendo este número estimado utilizando o teste Probit.

Gráfico 1 - Estimativa da CL-50 de extrato de *P. elliotii* em *R. quelen*.



Fonte: SANTOS, 2016.

A dose de tratamento recomendada como eficiente para o combate à *L. cyprinacea* é de 8 kg/400 m³ (REVISTA PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997; CASACA; TOMAZELLI JÚNIOR, 2000), que corresponde a 0,02 g/L, portanto a CL-50 estimada foi 48 vezes maior que a concentração de tratamento. Além disso, a sobrevivência de 100% dos animais foi encontrada em tratamento com 0,8 g/L do extrato, demonstrando que a concentração de tratamento recomendada para pisciculturas parece segura para a sobrevivência dos animais.

Tóro et al. (2003) utilizou em seu experimento a resina bruta de *Pinus* spp. para a espécie de peixe *Leporinus* sp., encontrando em 48 horas a concentração da CL-50 de 0,2 g/L. Mesmo considerando diferenças na espécie submetida ao tratamento, aparentemente, a toxicidade da resina é superior à toxicidade do extrato bruto de acículas, pois a CL-50 encontrada para a resina foi aproximadamente 5 vezes menor que a estimada para o extrato de acículas.

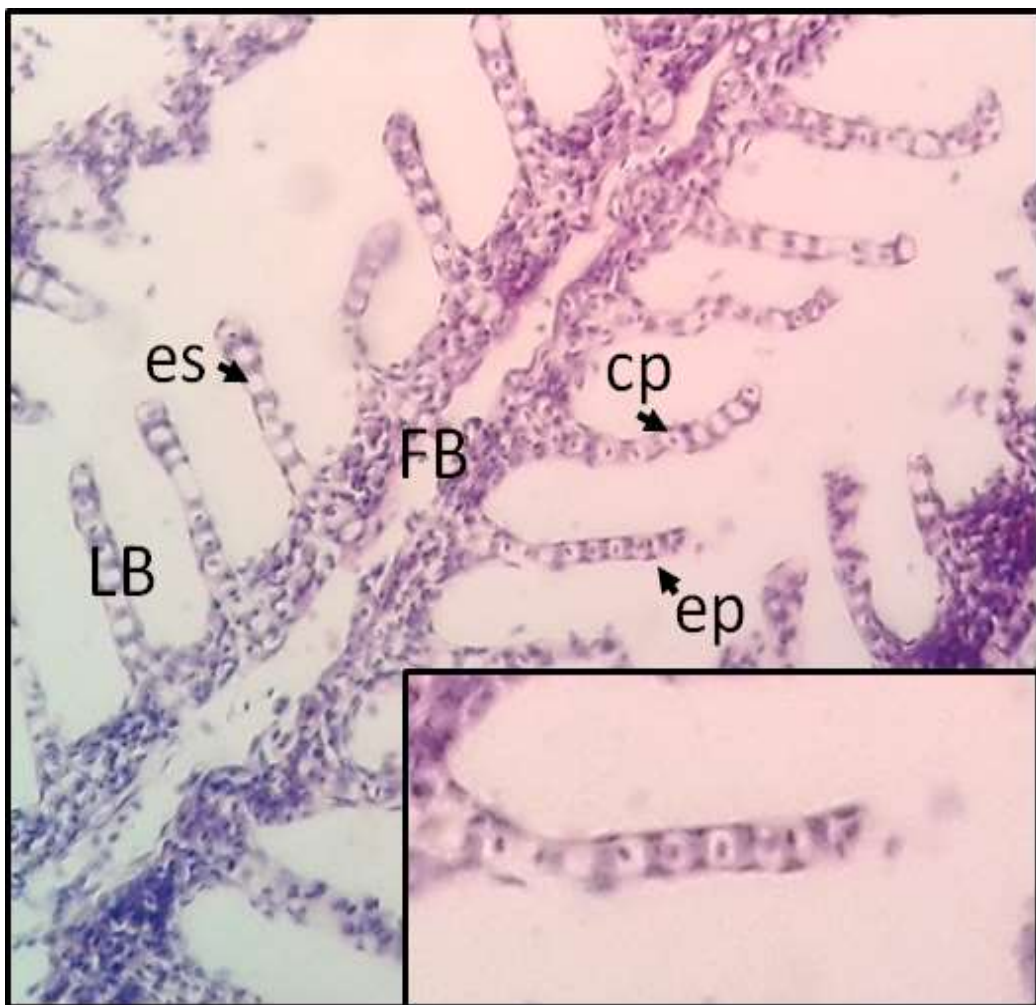
5.2 Análises histológicas

A partir das análises morfológicas de brânquias, fígado e rim, observou-se alterações consideradas como drásticas nos órgãos dos animais sobreviventes aos ensaios da CL-50, em todas as concentrações, constatando os possíveis efeitos que o tratamento com *P. elliotii* pode proporcionar aos animais, através de biomarcadores histológicos. Estes órgãos foram escolhidos para a realização da diagnose, devido ao potencial contato com os resíduos do tratamento e devido às funções que exercem no organismo. As brânquias são importantes marcadores devido a proximidade e contato direto com a água (MALLAT, 1985; FANTA et al., 2003; BOEGER et al., 2003; ROMÃO et al., 2006); o fígado pode ser exposto às concentrações de substâncias tóxicas durante o desenvolvimento de suas funções de metabolização e biotransformação (RODRIGUES; FANTA, 1998; FANTA et al., 2003; BOEGER et al., 2003; ROMÃO et al., 2006); e os rins são órgãos expostos durante o processo de excreção (LANDOLT, 1975; ROBERTS, 1989; ROMÃO et al., 2006).

5.2.1 Análise histológica de brânquias

Nas análises observadas em brânquias de animais controle, ou seja, sem tratamento com *P. elliottii*, foi verificada estrutura histológica característica de peixes, com as lamelas branquiais ou respiratórias formadas de espaço sanguíneo sustentado por células pilares e recoberto por uma camada fina de tecido epitelial simples pavimentoso (Figura 21) (GEORGE; CASTRO, 1998).

Figura 21. Corte histológico de brânquia de *R. quelen* controle. Legenda: FB: filamento branquial, LB: lamela branquial, es: espaço sanguíneo, cp: célula pilar, ep: epitélio. Ampliação 400x, destaque 800x.



Fonte: CARVALHO, 2016.

Em animais tratados, observou-se uma desorganização na estrutura branquial, confirmando que substâncias tóxicas causam profundos efeitos na estrutura e função de brânquias de peixes, devido sua proximidade e contato direto com a água (MALLAT, 1985; FANTA et al., 2003; BOEGER et al., 2003; ROMÃO et al., 2006). As lamelas branquiais aumentaram de espessura e algumas romperam. Houve hipertrofia

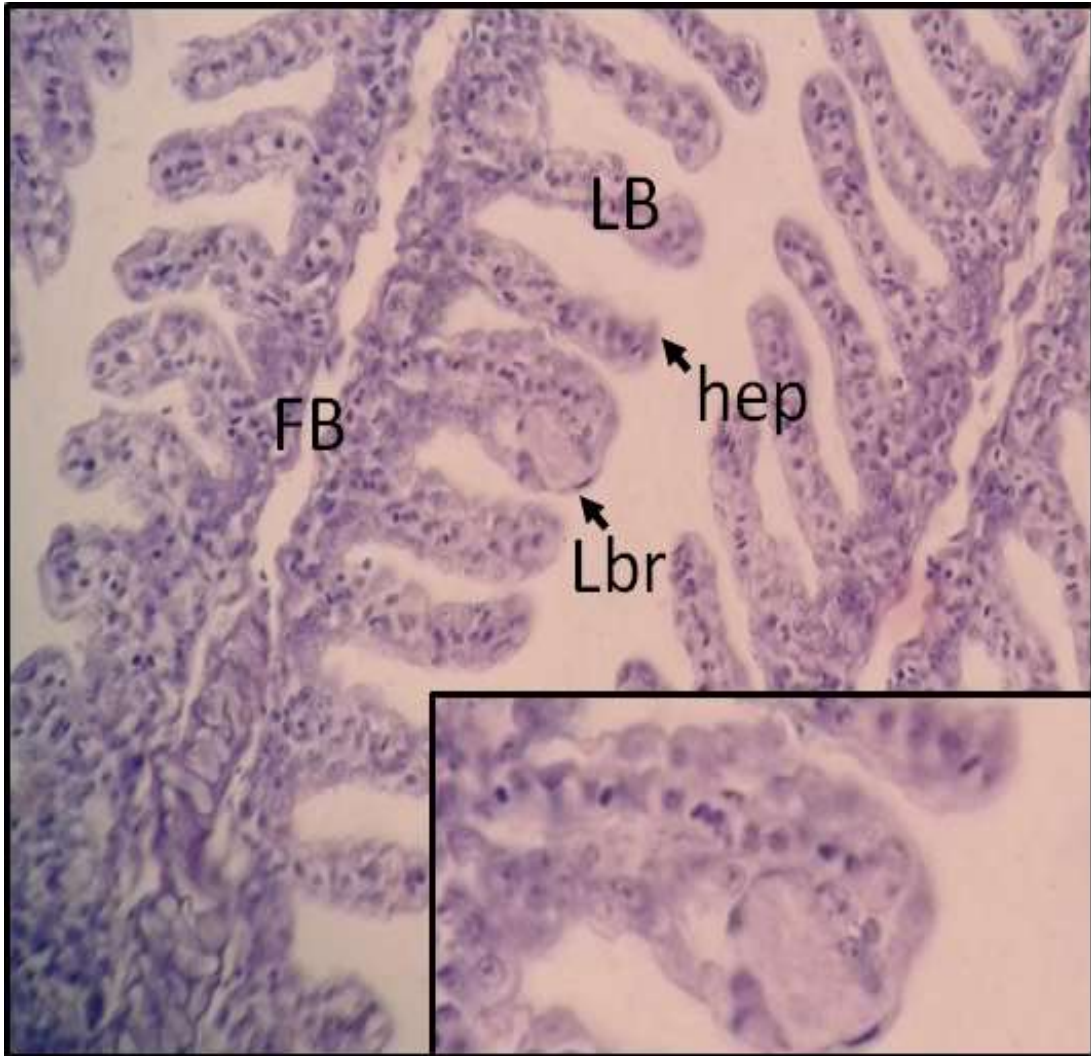
das células epiteliais aumentando a distância entre a água e a corrente sanguínea (Figuras 22 e 23), o que certamente dificulta as trocas gasosas, principal função da estrutura. Estas condições causam redução da passagem de oxigênio para o sangue e tendem a levar o animal a óbito em poucas horas (BALDISSEROTTO, 2013).

Figura 22. Corte histológico de brânquia de *R. quelen* tratado com *P. elliotii* em concentração 0,067 g/L. Legenda: FB: filamento branquial, LB: lamela branquial, hep: hipertrofia das células epiteliais. Ampliação 400x, destaque 800x.



Fonte: CARVALHO, 2016.

Figura 23. Corte histológico de brânquia de *R. quelen* tratado com *P. elliotii* na concentração 2,2 g/L. Legenda: FB: filamento branquial, LB: lamela branquial, Lbr: lamela branquial rompida, hep: hipertrofia das células epiteliais. Ampliação 400x, destaque 800x

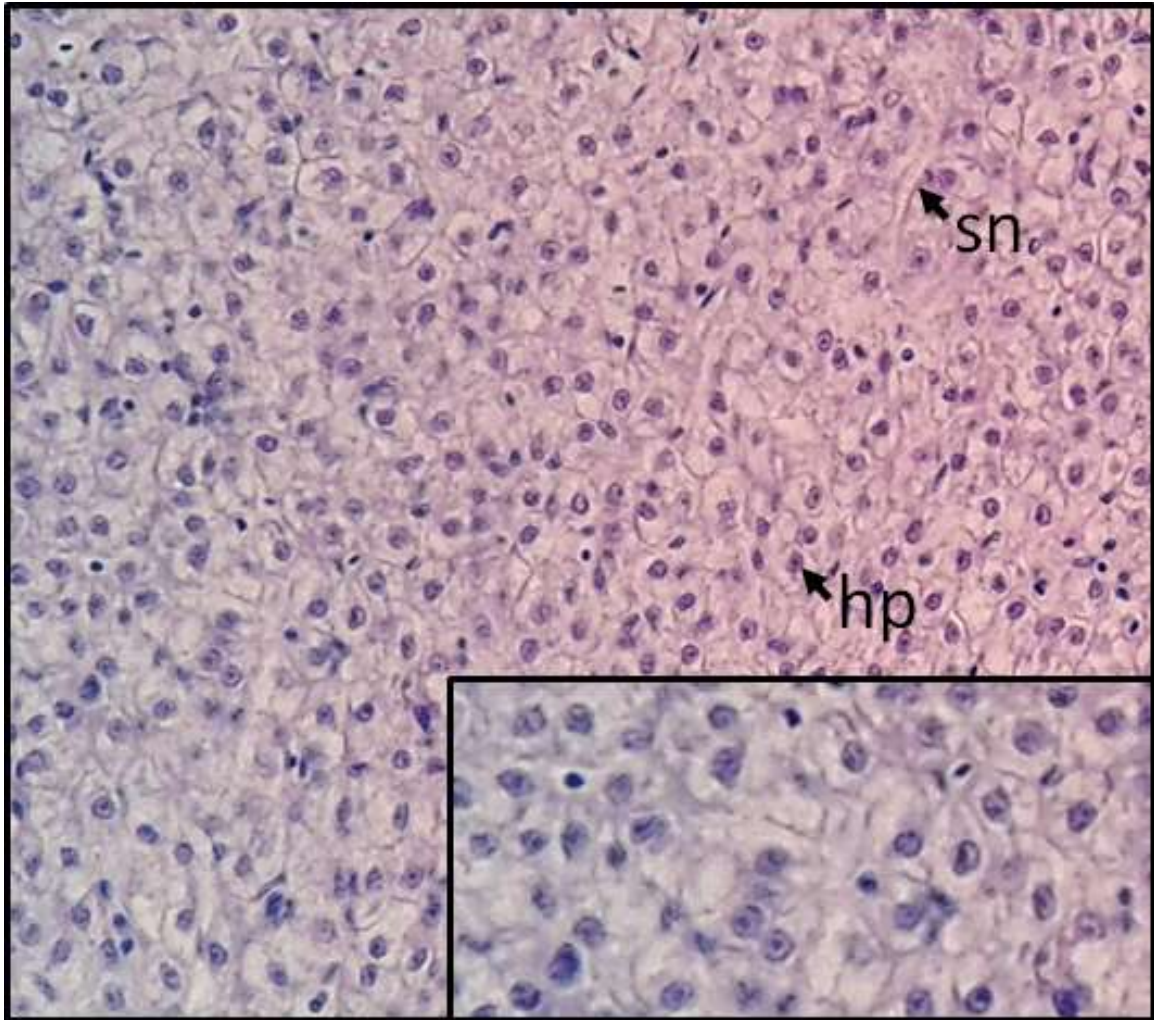


Fonte: CARVALHO, 2016.

5.2.2 Análise histológica de fígado

Nas análises de fígado dos animais controle, ou seja, dos que não foram submetidos ao tratamento com *P. elliotii*, foram observados hepatócitos intercalados a sinusóides, sendo estas características histológicas típicas do órgão (Figura 24) (GEORGE; CASTRO, 1998).

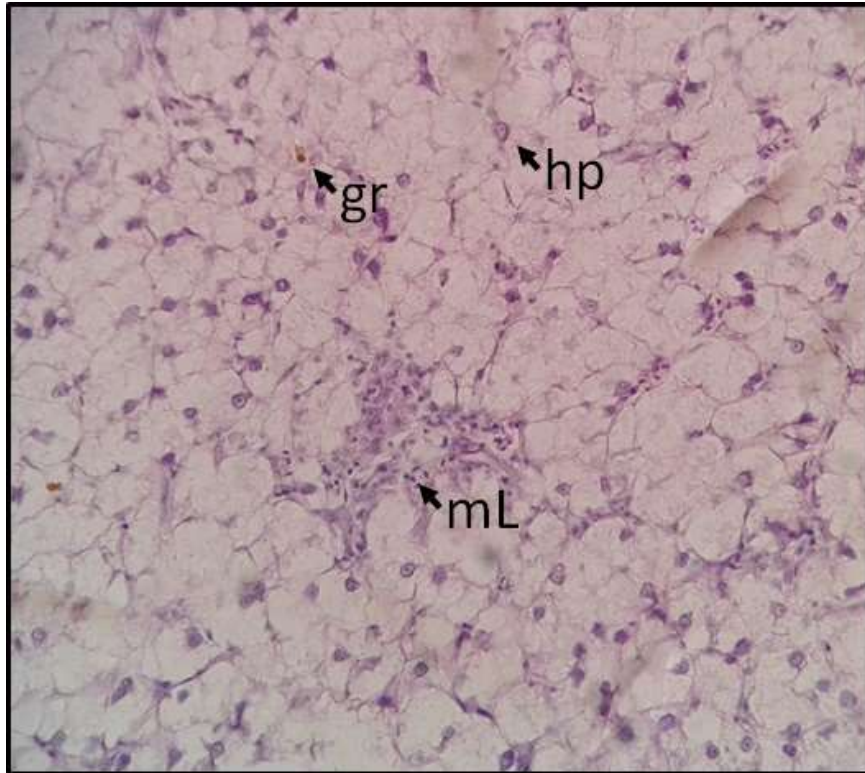
Figura 24. Corte histológico de fígado de *R. quelen* controle. Legenda: hp: hepatócitos, sn: sinusóides. Ampliação 400x, destaque 800x.



Fonte: CARVALHO, 2016.

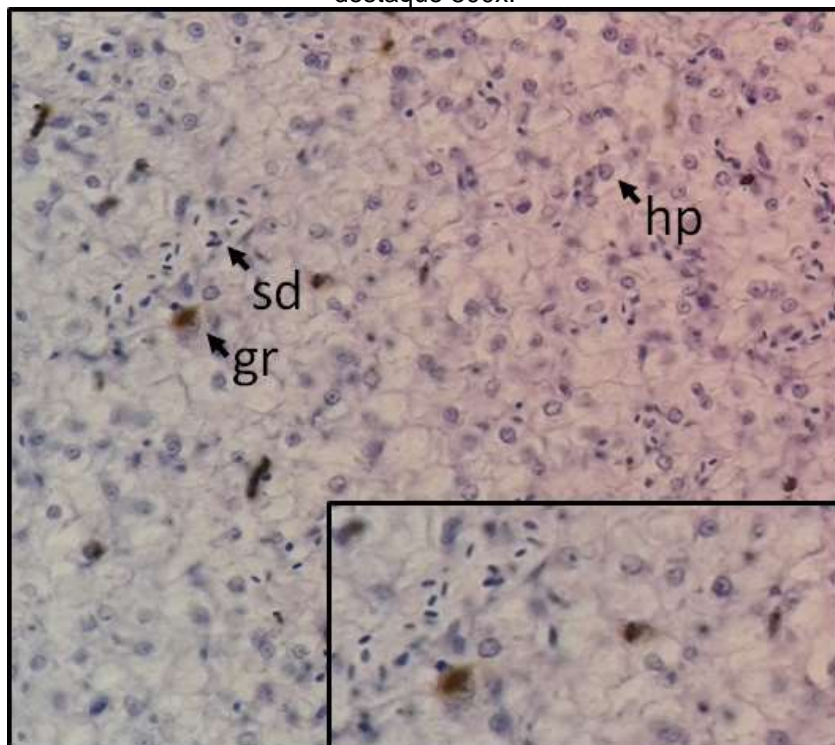
Em animais tratados, foram encontradas alterações no tecido, e as principais alterações encontradas foram migração leucocitária e grumos de coloração marrom (Figuras 25 e 26), indicando vesículas de fagocitose de células fagocitárias, evento característico de distúrbios hematológicos (ROBBINS et al., 1996; ROMÃO et al., 2006).

Figura 25. Corte histológico de fígado de *R. quelen* tratado com *P. Elliottii* em concentração 0,067 g/L. Legenda: hp: hepatócitos, gr: grumos de coloração marrom, mL: migração leucocitária. Ampliação 400x.



Fonte: CARVALHO, 2016.

Figura 26. Corte histológico de fígado de *R. quelen* tratado com *P. Elliottii* na concentração 2,2 g/L. Legenda: hp: hepatócitos, gr: grumos de coloração marrom, sd: sinusóide dilatado. Ampliação 400x, destaque 800x.

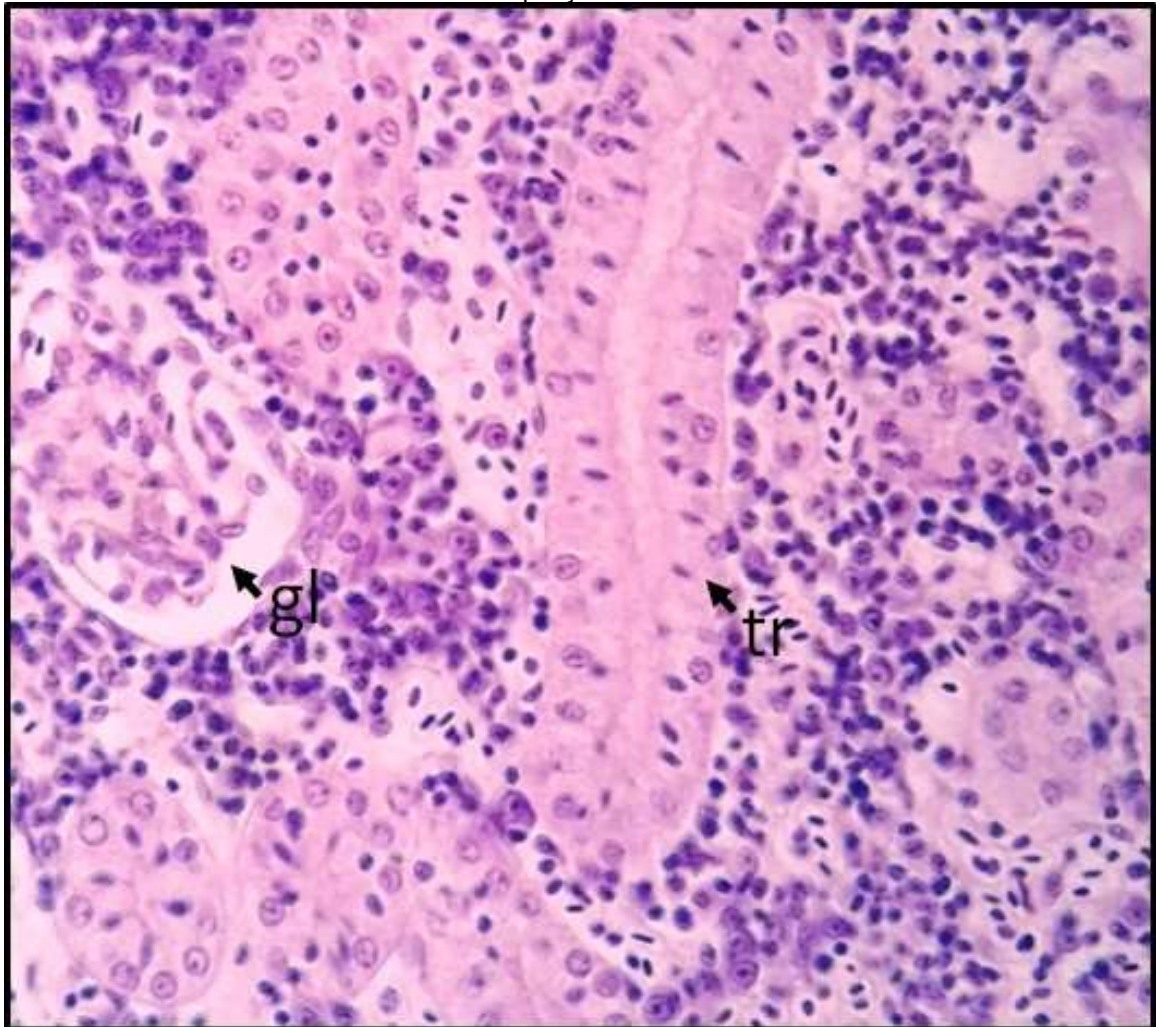


Fonte: CARVALHO, 2016.

5.2.3 Análise histológica de rim

Nas análises observadas em rins de animais controle, ou seja, sem tratamento com *P. elliottii*, foi verificada estrutura histológica característica de peixes, identificando conjuntos de glomérulos e túbulos renais mergulhados em tecido hematopoiético (Figura 27) (GEORGE; CASTRO, 1998; ROMÃO et al., 2006).

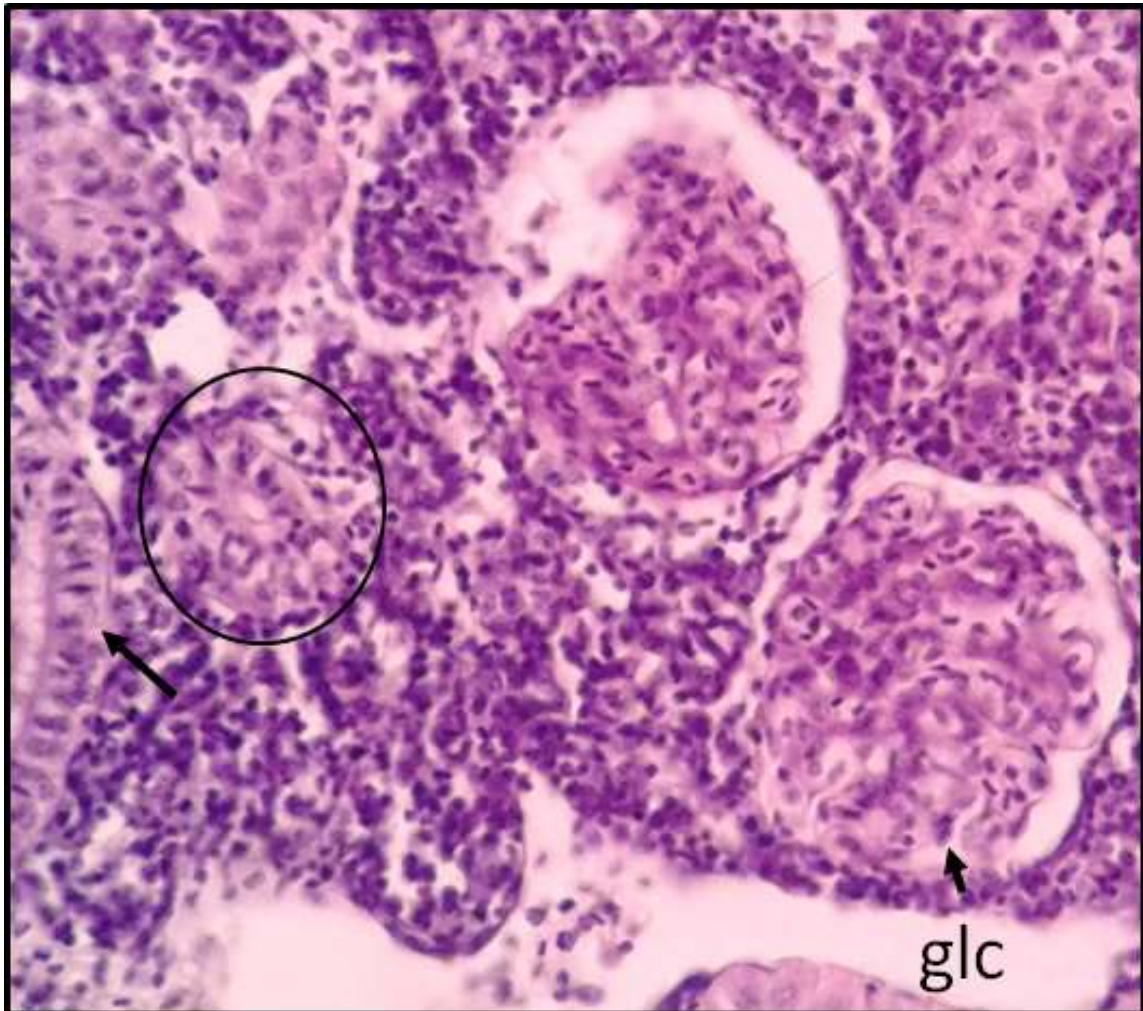
Figura 27. Corte histológico de rim de *R. quelen* controle. Legenda: gl: glomérulos, tr: túbulos renais. Ampliação 400x.



Fonte: CARVALHO, 2016.

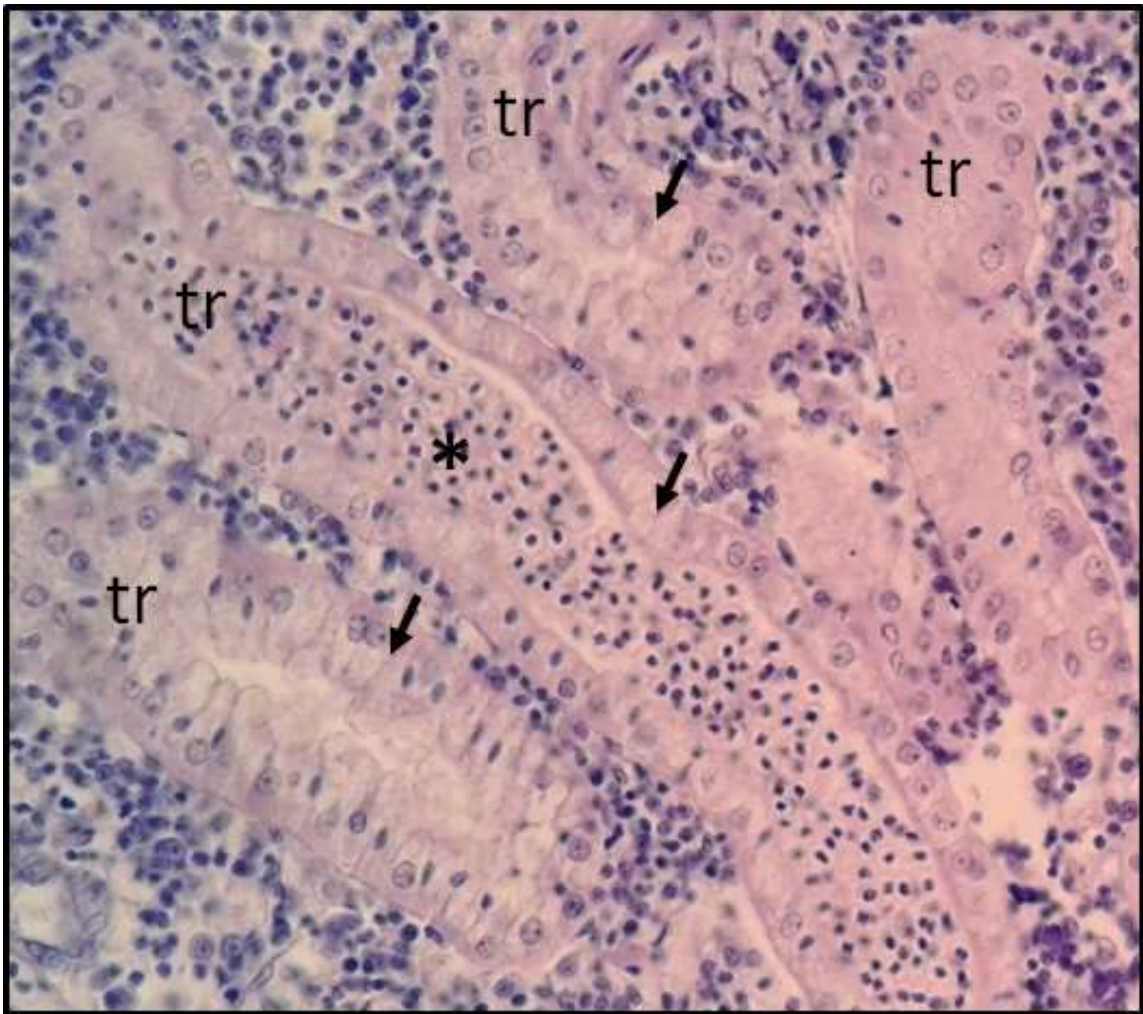
Nos animais submetidos às diferentes concentrações dos extratos no teste de CL-50, foram observadas regiões tubulares com degeneração celular apresentando citoplasmas pálidos, vacuolizados e núcleos picnóticos. Foram observadas hemorragias no interior dos túbulos e restos de reações inflamatórias, definidas como hemossiderina, assim como glomérulos dilatados e congestionados (Figuras 28 e 29) (ROBBINS, 1996).

Figura 28. Corte histológico de rim de *R. quelen* tratado com *P. Elliottii* em concentração 0,067 g/L. Legenda: glc: glomérulo congestionado, seta: túbulo renal com alterações celulares, destaque: túbulos renais sendo reabsorvidos por leucócitos tissulares. Ampliação 400x.



Fonte: CARVALHO, 2016.

Figura 29. Corte histológico de rim de *R. quelen* tratado com *P. Elliottii* na concentração 2,2 g/L. Legenda: tr: túbulos renais, seta: túbulos renais com alterações celulares, asterisco: túbulo renal contendo células sanguíneas em sua luz. Ampliação 400x.



Fonte: CARVALHO, 2016.

Relacionando as alterações que foram encontradas nas brânquias, fígado e rins dos animais tratados, pode-se sugerir que nas brânquias houve maior efeito de primeiro contato com as substâncias tóxicas oriundas do extrato de pinus e uma tentativa de proteção do organismo dificultando a penetração dos compostos. Nos órgãos fígado e rins, os efeitos encontrados indicam maior concentração dos compostos tóxicos, demonstrando uma relação com a detoxificação (fígado) e eliminação (rim) das moléculas tóxicas. Os efeitos hepáticos de presença de grumos de coloração marrom e migração leucocitária combinados com os efeitos na morfologia renal de congestão glomerular, degeneração tubular e presença de hemácias na luz tubular sugerem distúrbios hematológicos originados pela ação de moléculas tóxicas presentes no extrato de pinus.

6 CONCLUSÃO

Na avaliação dos resultados conclui-se que o *Pinus* spp. é tóxico para os peixes da espécie *R. quelen*, sendo estimada a CL-50 em 0,963 g/L de extrato aquoso. Os órgãos brânquia, fígado e rins são afetados pelo extrato, a partir da concentração de 0,07 g/L. Como a dose recomendada no tratamento corresponde a 0,02 g/L, e a CL-50 foi 48 vezes maior, considera-se que a faixa de concentração do tratamento é segura, porém são necessárias análises fisiológicas dos animais tratados para confirmar esta informação.

REFERÊNCIAS

AL-HAMED, Mahmoud I.; HERMIZ, Layla. **Experiments on the control of anchor worm (*Lernaea cyprinacea*)**. *Aquaculture*, v. 2, p. 45-51, 1973. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0044848673901257>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

ANVISA. **Agrotóxicos e Toxicologia** / Publicação Agrotóxico Toxicologia. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia!/ut/p/c5/rY_NlqlwEEafxQdoE0FCWAYViJgofxHYcMC2EQFFUUCevj1nVrOYnk1_d1I16tYHYvDmknZFnj6K6yWtQAhilCxMYS3VDYQQ6QtITyUjxdICU0ZgD0I4T7zzq6FjObpnONiPs7vjGenZ0th4o8HZXbC2HLgHnwNfMuj50cj9qldYmwnDWZetofAZTN6uCCXwHyHww5_EP2zArfRn_sP9CMRqlkwJW7Y5g1tbWkK64s6aMAtyMQf-L3b922WuVf3t8i1jCw3ZE_KvutYgLRj62h_qKZxiZYaxhmRNQ4qGkAz2fiQNY5blqxVPTs6rzbMqG_KXYBf3-qwgabyDfIJpmzJRtDRrYlTmFwkP9df1FhRqlqpdd5wra-TCS0ZxyKQmtsOq3ZGOPh3xsPYB3ePxbNBj9KHoh9eN1jeH-1KsBp9svJXK49N28gOKTmGgCs8V9Uj7zVCiWbIL6-HO_YVcSFVGz01v8HtifFETBw9WibGv2Tq2ha4v3bLA3ceNDLvw3rUkr6yycSYTwK1rfQRN3W2Qi2dv5JxMJt8zdy5/?1dmy&urile=wcm%3apath%3a/anvisa+portal/anvisa/inicio/agrotoxicos+e+toxicologia/publicacao>. Acesso em: 28 jun. 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos/0afb3f3b-7a32-4232-a7e2-de8ef460c9f7>>. Acesso: 06 nov 2016.

AQUA CULTURA. **Masoten**. Disponível em: <<http://www.aquasem.com.br/images/masoten.pdf>> Acesso: 10 dez 2016.

BALDISSEROTTO, Bernardo; NETO, João Radünz. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004.

BEÇAK, Willy; PAULETE, Jorge. **Técnicas de citologia e histologia**. v.1. Rio de Janeiro: Editora S.A, 1976.

BOEGER, Walter A.; OSTRENSK, Antonio; GUIMARÃES, Ana Tereza Bittencourt; ROMÃO Sílvia. **Histopathology as an approach to evaluate the effect of an oil spill on fishes of the rivers Saldanha, Barigui, and Iguazu (Brazil)**. *Proceedings of International oil Spill Conference*, 2003.

BRUSCA, Richard C.; BRUSCA, Gary J. **Invertebrados**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

CARRIEL, Katiele Cardozo. **Levantamento da presença de *Lernaea* spp. (Lernaeoidea: Lernaeidae) em pisciculturas da associação de produtores de peixes de Laranjeiras do Sul – PR (PEIXELAR)**. 2014. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Aquicultura) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2014.

CASACA, J. M.; TOMAZELLI JÚNIOR, O. **Tratamento de Lerneoses no Oeste de Santa Catarina**. Resumos do VI Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos e II Encontro Latino-Americano de Patologistas de Organismos Aquáticos. Florianópolis: ABRAPOA, 2000.

CASAGRANDE, Gilmar Roque. **Resultado de Cultivo e Desenvolvimento da Atividade Piscícola no Oeste de Santa Catarina**. Laranjeiras do Sul: UFFS, 2014. (Comunicação oral).

COSTA, Carla Regina; OLIVI, Paulo. BOTTA, Clarice M. R.; ESPINDOLA, Evaldo L. G. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação**. Quím. Nova, v. 31, n. 7, 1820-1830, 2008. Disponível em: <http://www.producao.usp.br/bitstream/handle/BDPI/6765/art_COSTA_A_toxicidade_em_ambientes_aquaticos_discussao_e_2008.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 06 dez. 2016.

DIÁRIO DA UNIÃO. **Masoten**. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/servlet/INPDFViewer?jornal=1&pagina=9&data=18/02/2015&captchafield=firistAccess>> Acesso em: 10 dez 2016.

FANTA, Edith; RIOS, Flávia Sant'Anna; ROMÃO, Silvia; VIANNA, Ana Cristina Casagrande; FREIBERGER, Sandra. **Histopathology of fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 54, 119-130, 2003.

FARIAS, M. P. O. et al. **Cálculo da CI-50 (concentração inibitória média) e CL-50 (Concentração Letal Média) do óleo da semente de andiroba (*Carapa guianensis*, aubl.) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.79, n.2, p.255-261, abr./jun., 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n2/a14v79n2.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, 2012. Disponível em: <www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Anuário FAO Pesca e da Aquicultura Statistic 2012**. 105 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/card/en/c/e533a964-a1a1-4d84-9de0-967eb3fa51e9/>>. Acesso em: 14 jun. 2015.

GABRIELLI, Mário Artur; ORSI, Mário Luís. **Dispersão de *Lernaea cyprinacea* (Linnaeus) (Crustacea, Copépoda) na região norte do estado do Paraná, Brasil**. Revista Brasileira de Zoologia, 2000.

GARTNER, Leslie P.; HIATT, James L. **Tratado de Histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GOMES, Levy de Carvalho; et al. **Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae)**. Ciência Rural, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782000000100029&script=sci_arttext&tlng=es>. Acesso em: 24 jun. 2015.

HASSAN, M. et al. **An introduced parasite, *Lernaea cyprinacea* L., found on native fresh water fishes in the south west of Western Australia**. Journal of the Royal Society of Western Australia, v. 91, n. 2, p. 149-153, 2008. Disponível em: <<http://researchrepository.murdoch.edu.au/4034/>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

HOROBIN, Richard W.; BANCROFT, John D. **Troubleshooting Histology Stains**. London: Churchill Livingstone, 1998.

KUBITZA, Fernando. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiá: F. Kubitza, 2011.

LANDOLT, M. **Visceral granuloma and nephrocalcinosis of trout**. In: The Pathology of Fishes. ed. Ribelin, W. E. and Migaki, G., The University of Wisconsin Press, p.793-801, 1975.

LERNAEA: Workshop propõe medidas de prevenção e tratamento. Panorama da Aquicultura, nº 40, p. 1, mar/abr. 1997. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/40/Lerneea40.asp>>. Acesso em: 23 jun. 2015.

MALLATT, Jon. **Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review**. Can. J. Fish. Aquat. Sci., vol. 42:630-648. 1985.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário**. PORTARIA Nº 48, DE 12 DE MAIO DE 1997. Disponível em <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=72818869> Acesso: 6 nov 2016.

MARCOGLIASE, D. J. **Seasonal occurrence of *Lernaea cyprinacea* on fishes in Belews Lake, North Carolina**. The Journal of Parasitology, 1991. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/med/2010869>. Acesso em: 16 jun. 2015.

MEYER, M.S., JOHNSON, L.L.; HOM, T.; COLLIEN, T.K.; STEIN, J. E.; VARANASI, U. (1998), **Toxicopathic Hepatic lesion in subadult English Sole (*Pleurinectes vetulus*) from Puget sound**. Washington, USA: Relationship with other Biomarkers of contaminant Exposure. Marine Environmental Research, vol. 45, nº 1, p-47-67.

Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2010. Disponível em: http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2013/luis_art4_rousseff.pdf. Acesso em: 06 dez. 2016.

Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2011. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol__bra.pdf. Acesso em: 06 dez. 2016.

MONTEIRO, Silvia Gonzalez. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2011.

MOURA, Emerson Eduardo Silva. **Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes**. 2009. Trabalho de Dissertação de Mestrado. (Bioecologia Aquática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guideline for Testing of chemical** – Fish, Acute Toxicity Test, 1992. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_9789264069961-en. Acesso: 06 nov 2016.

POTGIETER, F. J.; TÖRRÖNEN, R.; WILKE P. I. **The in vitro enzyme-inducing and cytotoxic properties of South African laboratory animal contact bedding and nesting materials.** *Laboratory Animals* (1995) 29, 163-171.

ROBERTS, R. J. **Fish Pathology.** Editora: Baillière Tindall, second edition, 467pg, 1989.

ROBBINS, Stanley L.; et al. **Patologia Estrutural e Funcional.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996.

RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. **Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500.** *Revista Brasileira de Zoologia*, vol.15, p.441-450, 1998.

RODRIGUES, K. C. S. **Resina de Pinus no Sul do Brasil: Caracterização e Perspectivas.** *Revista da Madeira.* N. 116. 2008. Disponível em: <http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1317&subject=Resina>. Acesso em: 28 jun.

ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, M. O.; TEIXEIRA, J.; KUSMA, J. **Blood Parameter Analysis and Morphological Alterations as Biomarkers on the Health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, p. 441-448, 2006.

RUPPERT, Edward E.; FOX, Richard S.; BARNES, Robert D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva.** São Paulo: Editora Roca, 2005.

SABOTTA, Johannes; WELSCH, Ulrich. **Atlas de Histologia: Citologia, Histologia e Anatomia Microscópica.** 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

SHIMIZU, Jarbas Yukio; SPIR, Ivana H. Z. **Seleção de *Pinus elliottii* pelo valor genético para alta produção de resina.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/282199/selecao-de-pinus-elliottii-pelo-valor-genetico-para-alta-producao-de-resina>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

SOUZA, Thayana Cruz. **Toxicidade aguda de agrotóxicos e Curva de Sensibilidade de Espécies para peixes amazônicos.** 2014. 53 f. Trabalho de

Dissertação de Mestrado (Ciências do Ambiente e Sustentabilidade da Amazônia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SPRAGUE. J. B. **Measurement of pollutant toxicity to fish I.** Bioassay methods for acute toxicity. Water Research Pergamon Press 1969. Volume 3, Issue 11, November 1969, Pages 793-821. Disponível em: <[TAVARES-DIAS, Marcos; MORAES, Flávio Ruas. **Hematologia de peixes teleósteos.** Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004.](http://link-periodicos-capes-gov-br.ez372.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?frbrVersion=3&ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info%3Aofi%2Fenc%3AUTF-8&ctx_tim=2016-12-12T17%3A27%3A02IST&url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=info%2Ffmt%3Akev%3Amtx%3Actx&rft_id=info%3Asid%2Fprimo.exlibrisgroup.com%3Aprimo3-Article-sciversesciencedirect_elsevier&rft_val_fmt=info%3Aofi%2Ffmt%3Akev%3Amtx%3Ajournal&rft.genre=article&rft.atitle=Measurement%20of%20pollutant%20toxicity%20to%20fish%20I.%20Bioassay%20methods%20for%20acute%20toxicity&rft.jtitle=Water%20Research&rft.bttitle&rft.aulast=Sprague&rft.auinit&rft.auinit1&rft.auinitm&rft.ausuffix&rft.au=Sprague%2C%20J.B.&rft.aucorp&rft.date=1969&rft.volume=3&rft.issue=11&rft.part&rft.quarter&rft.ssn&rft.spage=793&rft.epage=821&rft.pages=793-821&rft.artnum&rft.issn=0043-1354&rft.eissn&rft.isbn&rft.sici&rft.coden&rft_id=info%3Aoi%2F&rft.object_id&svc_val_fmt=info%3Aofi%2Ffmt%3Akev%3Amtx%3Asch_svc&rft.eisbn&rft_dat=%3Csciveresciencedirect_elsevier%3E0043-1354(69)90050-5%3C%2Fsciversesciencedirect_elsevier%3E%3Cgrp_id%3E4602034146186764579%3C%2Fgrp_id%3E%3Coa%3E%3C%2Foa%3E%3Curl%3E%3C%2Furl%3E&svc.fulltext=yes&req.language=por>. Acesso: 01 dez 2016.</p>
</div>
<div data-bbox=)

THRALL, Mary Anna; et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária.** São Paulo: Roca, 2006.

TÓRO, Rosa M. et al. **Activity of the *Pinus elliottii* resin compounds against *Lernaea cyprinacea* in vitro.** Veterinary Parasitology. v. 118, n. 1-2, p. 143-149, Dec. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401703003637>>. Acesso em: 20 jun. 2015.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). **Statistical Analysis for Biological Methods.** Probit Analysis. Disponível em: <<http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm>>. Acesso: 11 nov 2016.

WAYNON, Johnson W. **Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates.** Series: United States. Fish and Wildlife Service. Resource

publication – United States, Fish and Wildlife Service. U.S. Government Printing Office.
Supt. Of Docs. No.: I 49.66:137. 1980.

ICONOGRAFIA

Gráfico 1 - Estimativa da CL-50 de extrato de *P. elliotii* em *R. quelen*. SANTOS, Alexandre Manoel dos. **Estimação da CL-50 de extrato de *P. elliotii* em *R. quelen***. 2016.

Figura 1 – *Lernaea cyprinacea*, principal causadora da lerneose – elaborado pelo autor.

Figura 2 - Fêmea de *L. cyprinacea* – PAVANELLI, Gilberto Cezar; EIRAS, Jorge da Costa; TAKEMOTO, Ricardo Massato. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3 ed. Maringá: Eduem, 2008.

Figura 3- Ciclo de vida da *L. cyprinacea* – AVENANT-OLDEWAGE, Anemariè. ***Lernaea cyprinacea* and Related Species**. In: WOO, Patrick T.K.; BUCHMANN, Kurt. *Fish Parasites, Pathobiology and Protection*. 400p. 2011.

Figura 4 - *L. cyprinacea* inserida em nadadeira dorsal (A) e caudal (B) de *R. quelen* - PEREIRA, Valternei Marcelo. ***R. quelen* infestado por *L. cyprinacea***. 2016.

Figura 5 - *R. quelen* infestado por *L. cyprinacea* em olhos (A), opérculo (B), tegumento (C) e nadadeira peitoral (D) – PEREIRA, Valternei Marcelo. ***L. cyprinacea* inserida em nadadeiras**. 2016.

Figura 6 - Exemplar de *P. elliotii* (pinus) – elaborado pelo autor.

Figura 7 - Acículas de *P. elliotii* – elaborado pelo autor.

Figura 8 - Exemplar de *R. quelen* (jundiá) – TIMM, Cláudio Dias. **Exemplar de *Rhamdia quelen***. 2009.

Figura 9 - Esquema de um arco branquial com filamentos e lamelas (hachurado). As setas indicam o seu fluxo sanguíneo – GEORGE, Luiz Ludovico; CASTRO, Rodrigo Roque Lesqueves de. **Histologia comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998.

Figura 10 - Esquema de um filamento branquial com três lamelas. As setas sinuosas indicam a direção do fluxo da água, e as pequenas, a direção da corrente sanguínea – GEORGE, Luiz Ludovico; CASTRO, Rodrigo Roque Lesqueves de. **Histologia comparada**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998.

Figura 11. Localização do rim em peixe – Uol. **Peixes**. Disponível em <<http://alunosonline.uol.com.br/biologia/peixes.html>>. Acessado em 01 de dezembro de 2016.

Figura 12 - Sistema digestório de peixe mostrando a localização do fígado – BALDISSEROTTO, Bernardo. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3 ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2013.

Figura 13 – Aclimação dos juvenis de *R. quelen* – ROMÃO, Silvia. **Juvenis de *R. quelen* submetidos ao teste da CL-50 com *P. elliottii***. 2015.

Figura 14 – Acículas de *P. elliottii* sendo maceradas e pesadas. – NASCIMENTO, Cristian Zwetzch. **Acículas de *P. elliottii* sendo maceradas e pesadas**. 2015.

Figura 15 – Acículas de *P. elliottii* prontas para serem imersas em água – AMARAL, Antonio Carlos Farias. **Acículas de *P. elliottii* prontas para serem imersas em água**. 2015.

Figura 16 – Juvenis de *R. quelen* submetidos ao teste da CL-50 com *P. elliottii* - ROMÃO, Silvia. **Aclimação dos juvenis de *R. quelen***. 2015.

Figura 17 – Equipe de trabalho realizando coleta de brânquias, fígado e rins – PASSARIN, Marília. **Equipe de trabalho realizando coleta de brânquias, fígado e rins**. 2016.

Figura 18 - Inclusão em parafina (A e B); estufa utilizada para séries de parafina (C); preparo da parafina para corte em micrótomo (D, E e F) - elaborado pelo autor.

Figura 19 – Micrótomo (A e B); “banho Maria” para esticar o corte (C e D); lâminas secando em chapa quente (E) – elaborado pelo autor.

Figura 20 - Capela com reagentes para desparafinização e coloração (A e B); lavagem com água corrente após séries alcólicas (C); corantes Hematoxilina de Harris e Eosina (D); montagem de lâmina permanente com resina para colagem da lamínula (E) – elaborado pelo autor.

Figura 21. Corte histológico de brânquia de *R. quelen* controle. Legenda: FB: filamento branquial, LB: lamela branquial, es: espaço sanguíneo, cp: célula pilar, ep: epitélio. Ampliação 400x, destaque 800x - elaborado pelo autor.

Figura 22. Corte histológico de brânquia de *R. quelen* tratado com *P. elliottii* em concentração 0,067 g/L. Legenda: FB: filamento branquial, LB: lamela branquial, hep: hipertrofia das células epiteliais. Ampliação 400x, destaque 800x - elaborado pelo autor.

Figura 23. Corte histológico de brânquia de *R. quelen* tratado com *P. elliottii* na concentração 2,2 g/L. Legenda: FB: filamento branquial, LB: lamela branquial, Lbr: lamela branquial rompida, hep: hipertrofia das células epiteliais. Ampliação 400x, destaque 800x – elaborado pelo autor.

Figura 24. Corte histológico de fígado de *R. quelen* controle. Legenda: hp: hepatócitos, sn: sinusóides. Ampliação 400x, destaque 800x – elaborado pelo autor.

Figura 25. Corte histológico de fígado de *R. quelen* tratado com *P. elliottii* em concentração 0,067 g/L. Legenda: hp: hepatócitos, gr: grumos de coloração marrom, mL: migração leucocitária. Ampliação 400x – elaborado pelo autor.

Figura 26. Corte histológico de fígado de *R. quelen* tratado com *P. elliottii* na concentração 2,2 g/L. Legenda: hp: hepatócitos, gr: grumos de coloração marrom, sd: sinusóide dilatado. Ampliação 400x, destaque 800x – elaborado pelo autor.

Figura 27. Corte histológico de rim de *R. quelen* controle. Legenda: gl: glomérulos, tr: túbulos renais. Ampliação 400x – elaborado pelo autor.

Figura 28. Corte histológico de rim de *R. quelen* tratado com *P. elliottii* em concentração 0,067 g/L. Legenda: glc: glomérulo congestionado, seta: túbulo renal com alterações celulares, destaque: túbulos renais sendo reabsorvidos por leucócitos tissulares. Ampliação 400x. – elaborado pelo autor.

Figura 29. Corte histológico de rim de *R. quelen* tratado com *P. elliottii* na concentração 2,2 g/L. Legenda: tr: túbulos renais, seta: túbulos renais com alterações celulares, asterisco: túbulo renal contendo células sanguíneas em sua luz. Ampliação 400x. – elaborado pelo autor.