

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA TERAPÊUTICA DO FORMOL  
EM LARVAS E JUVENIS DE PACAMÃ  
(*Lophiosilurus alexandri*)**

LUANNA DO CARMO NEVES

BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG  
2017

LUANNA DO CARMO NEVES

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA TERAPÊUTICA DO FORMOL EM LARVAS  
E JUVENIS DE PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para Obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal/Aquacultura.

Prof. Orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz.

BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG  
2017

N518a Neves, Luanna do Carmo, 1989-  
Avaliação da segurança terapêutica do formol em larvas e juvenis de Pacamã  
(*Lophiosilurus alexandri*) / Luanna do Carmo Neves. – 2017.  
56 p. : il.

Orientador: Ronald Kennedy Luz  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Pacamã (Peixe) – Teses. 2. Peixe – Larva – Doenças – Tratamento – Teses.  
3. Produção animal – Teses. I. Luz, Ronald Kennedy. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 639.3

DISSERTAÇÃO defendida e aprovada em 28/07/2017 pela Comissão Examinadora  
composta pelos seguintes membros:



---

Prof.º Dr. Ronald Kennedy Luz (Orientador)



---

Prof.º Dr. Carlos Augusto Gomes Leal



---

Prof.º Dr. José Dias Corrêa Junior

*“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.*

Clarice Lispector

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais Rute e José Edson pelo amor incondicional, por todo apoio e incentivo.

Dedico à minha irmã Luciana pelo companheirismo e paciência.

Dedico ao João Paulo pelo amor, amizade, apoio e união durante os momentos difíceis.

Dedico também aos meus familiares e amigos que estiveram sempre ao meu lado.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador Professor Dr. Ronald Kennedy Luz, obrigada pela orientação e principalmente, pela oportunidade e confiança. Agradeço-o ainda pelos incentivos e ensinamentos. *“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”* (Cora Coralina). Muito obrigada por acreditar em mim.

Ao meu co-orientador Kleber Campos Miranda Filho pelos ensinamentos e convivência durante toda graduação e mestrado, obrigada pela paz e equilíbrio nos momentos difíceis, foram essenciais nessa caminhada.

À minha co-orientadora Cintia Labussière Nakayama, obrigada pela confiança, ajuda, sugestões e conselhos para o desenvolvimento e finalização desse trabalho.

À equipe da larvicultura e maricultura pelo suporte na execução dos experimentos.

Aos técnicos de Laboratório do LAQUA e da histopatologia do Hospital Veterinário, por toda ajuda.

Ao João Paulo, pela participação direta no trabalho, pela disposição e dedicação na execução dos experimentos, pelo companheirismo, força nas horas difíceis, agradeço por acreditar em mim, pelo carinho e amor.

Aos meus grandes amigos, Amanda Hastenreiter do Espírito Santo, Angélica da Silva Ferreira, Camila Gomes de Oliveira, Deliane Cristina Costa, Raphael Nogueira Bahiense e Walisson Souza e Silva pela amizade sincera, pelo apoio nos momentos de desânimo e principalmente pelas discussões que sempre acabam em pizza, crepe, japonês e Malleta.

Ao Márcio, Franklin e Filipe por todos momentos compartilhados e trocas de conhecimento.

À FAPEMIG e CNPQ pelo auxílio financeiro para a realização da pesquisa.

Enfim, a todos que me apoiaram, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1. Pacamã .....	13
2.2. Uso do formol .....	15
2.3. Teste de toxicidade.....	17
2.4. Brânquias .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	22
<b>5. ARTIGO</b> .....	33
<b>Resumo</b> .....	33
<b>Abstract</b> .....	34
<b>1. Introdução</b> .....	35
<b>2. Material e métodos</b> .....	36
2.1 Produção de larvas e juvenis .....	36
2.2 Testes preliminares de toxicidade aguda do formol.....	36
2.3 Experimento 1 .....	37
2.4 Experimento 2 .....	37
2.5 Experimento 3 .....	38
2.6 Nível de segurança .....	38
2.7 Análise histopatológica .....	38
2.8 Análises estatísticas .....	40
<b>5.5. Resultados</b> .....	40
5.5.1. Experimento 1 .....	40
5.5.2. Experimento 2 .....	41
5.5.3. Experimento 3 .....	42
<b>5.6. Discussão</b> .....	45
<b>5.7. Conclusão</b> .....	48
<b>5.8. Referências bibliográficas</b> .....	48
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	54
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	54



---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> Alterações histopatológicas de brânquias, assim como seus estágios de severidade ao tecido.....	39
<b>Tabela 2:</b> Concentrações letais (CL50) de formol estimadas de acordo com o registro de mortalidades ao longo de 12 h de exposição para <i>Lophiosilurus alexandri</i> de sete dias pós eclosão. ....	40
<b>Tabela 3:</b> Concentrações letais (CL50) de formol estimadas de acordo com o registro de mortalidades ao longo de 12 h de exposição para <i>Lophiosilurus alexandri</i> de 22 dias pós eclosão. ....	41
<b>Tabela 4:</b> Concentrações letais (CL50) de formol estimadas de acordo com o registro de mortalidades ao longo de 12 h de exposição para <i>Lophiosilurus alexandri</i> de 45 dias pós eclosão. ....	43
<b>Tabela 5:</b> Grau de alteração (DTC) para brânquias de juvenis de <i>Lophiosilurus alexandri</i> com 45 dias pós eclosão, submetidos a diferentes concentrações de formol no experimento 3. ....	45

---

## LISTA DE FIGURAS

---

**Figura 1:** Pacamã *Lophiosilurus alexandri*. Fonte: Cristiano Campos Mattioli. .... 15

**Figura 2:** Desenho esquemático de lesões branquiais comuns induzidas por compostos tóxicos. (A: estado normal; B, C, D, E e F: alterados). Abreviações: lb: lâmina basal; cc: célula de cloreto; mu: célula mucosa; pi: célula pilar; ce: célula epitelial lamelar; svl: seio venoso lamelar; csm: canal sanguíneo marginal. Adaptado de Machado et al. (1999). Fonte: Stella Rubim, 2017..... 20

**Figura 3:** Fotomicrografias de brânquias de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* expostos ao formol. A. Grupo controle. B. Tratamento 54 mg L<sup>-1</sup> de formol: Hiperplasias leves (setas). C. 216 mg L<sup>-1</sup> de formol: hiperplasias moderadas (setas). D. 432 mg L<sup>-1</sup> de formol: Desprendimentos do epitélio de moderado a severo (ponta de seta). E. 648 mg L<sup>-1</sup> de formol: Desprendimento do epitélio severo com hiperplasias (ponta de seta). (Aumento de 20x; barra de 100 µm) F. 648 mg/L de formol: Imagem panorâmica dos filamentos branquiais (aumento de 10x; barra 200 µm)..... 42

**Figura 4:** Fotomicrografias de brânquias de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* expostos ao formol. A. Grupo controle. B. Tratamento 86,4 mg L<sup>-1</sup> de formol: Hiperplasias leves (seta). C. 172,8 mg L<sup>-1</sup> de formol: hiperplasias leves (seta) e alguns desprendimentos do epitélio (ponta de seta). D. 345,6 mg L<sup>-1</sup> de formol: Hiperplasias de leve a moderada (seta) e desorganizações lamelares (\*). E. 691,2 mg L<sup>-1</sup> de formol: Hiperplasias (seta) seguidas de começo de fusão lamelar (FL). F. 10368 mg L<sup>-1</sup> de formol: Desprendimentos do epitélio severo nas lamelas (ponta de seta). (Aumento de 20x; barra de 100 µm)..... 44

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

CEUA - Comissão de ética no uso de animais - UFMG

CL50 - Concentração letal

cm - Centímetro

DTC - Degree of tissue change

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FDA - *Food and Drug Administration*

FL - Fusão lamelar

g - Grama

h - Hora

HE - Hematoxilina/eosina

IBAMA - Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis

IC - Intervalo de confiança

Kg - Quilograma

Km - Quilômetro

L - Litro

LAQUA - Laboratório de Aquacultura da UFMG

mg - Miligrama

mm - Milímetros

pH - Potencial hidrogeniônico

ppmil - Partes por mil

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

x - Vezes

µm – Micrômetro

α - Alfa

## RESUMO

A etapa da larvicultura é considerada uma das fases mais críticas na produção de peixes, sendo necessário o desenvolvimento de manejos adequados para que se tenha sucesso na produção de peixes. Com a intensificação, a larvicultura pode ser acometida por doenças e parasitoses decorrentes de baixa qualidade da água, além de estresse dos animais deixando-os mais susceptíveis à elas. Os parasitos têm importância na piscicultura por causar prejuízos econômicos aos produtores, pois podem causar baixo desempenho ou até mesmo mortalidades. Existem tratamentos profiláticos e terapêuticos com produtos químicos que são realizados por meio de banhos de imersão. Entre os mais utilizados se destaca o formol que se demonstra eficaz na profilaxia e tratamento de ectoparasitas. Porém, é necessária a realização de testes de toxicidade que mostrarão a dose ideal que não prejudique o desenvolvimento do animal, podendo essa ser espécie-específica, e ser influenciada, também, por fatores como idade e sexo. O objetivo deste estudo avaliar a toxicidade aguda, alterações patológicas e nível de segurança terapêutica do formol em larvas e juvenis de *Lophiosilurus alexandri*. Foram realizados três experimentos em diferentes idades. Experimento 1, larvas com peso médio de  $0,021 \pm 0,003$  g foram submetidas às concentrações 43,2; 86,4; 172,8; 345,6; 691,2 e 1404,0 mg L<sup>-1</sup> de formol, além do controle (sem adição de formol). No experimento 2, juvenis com peso médio de  $0,23 \pm 0,03$  g foram submetidos a concentrações de 54,0; 108,0; 216,0; 432,0 e 648,0 mg L<sup>-1</sup> de formol mais o controle. Já, no experimento 3, juvenis pensando em média  $3,75 \pm 0,81$  g foram submetidos as concentrações 86,4; 172,8; 345,6; 691,2 e 1036,8 mg L<sup>-1</sup> de formol e controle. As CL50 de 12 horas para experimento 1 foi de 108,86 mg L<sup>-1</sup> com intervalo de confiança (IC) entre 99,06 a 119,63 mg L<sup>-1</sup>, no experimento 2 foi de 152,74 mg L<sup>-1</sup> com IC entre 142,62 - 156,18 mg L<sup>-1</sup> e para o experimento 3, 244,38 mg L<sup>-1</sup> e IC entre 224,37 - 251,23 mg L<sup>-1</sup> de formol. Os juvenis expostos a concentrações crescentes de formol apresentaram alterações patológicas graves nas brânquias, dentre elas, hiperplasias das lamelas secundárias, desprendimento do epitélio, início de fusão lamelar e telangiectasias. Pode-se verificar que animais do experimento 2 sofreram mais alterações nas brânquias quando comparados aos animais do experimento 3. Conclui-se que a idade e estágio de desenvolvimento influencia na sensibilidade dos animais em relação à exposição do formol.

Palavras-chave: Formalina, toxicidade, peixe nativo, siluriforme.

## ABSTRACT

The stage of larviculture is considered one of the most critical phases in the production of fish, and it is necessary to develop adequate management for success in the production of fish. With intensification, larviculture can be affected by diseases and parasitic diseases resulting from poor water quality, as well as animal stress, making them more susceptible to them. Parasites are important in fish farming because they cause economic losses to producers, as they can cause poor performance or even mortality. There are prophylactic and therapeutic treatments with chemicals that are performed by immersion baths. Among the most used, formaldehyde is shown to be effective in the prophylaxis and treatment of ectoparasites. However, it is necessary to perform toxicity tests that will show the ideal dose that does not harm the development of the animal, which may be species-specific, and be influenced, also, by factors such as age and sex. The objective of this study was to evaluate the acute toxicity, pathological changes and level of therapeutic safety of formalin in larvae and juveniles of *Lophiosilurus alexandri*. Three experiments were carried out at different ages. Experiment 1, larvae with a mean weight of  $0.021 \pm 0.003$  g were submitted to concentrations 43.2; 86.4; 172.8; 345.6; 691.2 and 1404.0 mg L<sup>-1</sup> of formaldehyde, in addition to the control (without addition of formalin). In experiment 2, juveniles with a mean weight of  $0.23 \pm 0.03$  g were submitted to concentrations of 54.0; 108.0; 216.0; 432.0 and 648.0 mg L<sup>-1</sup> formaldehyde plus the control. Already, in experiment 3, juveniles thinking on average  $3.75 \pm 0.81$  g were submitted to concentrations 86.4; 172.8; 345.6; 691.2 and 1036.8 mg L<sup>-1</sup> formaldehyde and control. The 12-hour LC<sub>50</sub> for experiment 1 was 108.86 mg L<sup>-1</sup> with a confidence interval (CI) of 99.06 to 119.63 mg L<sup>-1</sup>, in experiment 2 it was 152.74 mg L<sup>-1</sup> with CI between 142.62 - 156.18 mg L<sup>-1</sup> and for experiment 3, 244.38 mg L<sup>-1</sup> and IC between 224.37 - 251.23 mg L<sup>-1</sup> of formaldehyde. Juveniles exposed to increasing concentrations of formaldehyde presented severe pathological changes in the gills, among them secondary lamella hyperplasias, epithelial detachment, lamellar fusion and telangiectasia. It can be verified that animals of experiment 2 suffered more changes in the gills when compared to the animals of experiment 3. It is concluded that the age and stage of development influences the sensitivity of the animals in relation to the exposure of the formalin.

Key words: Formalin, toxicity, native fish, siluriform.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, a urbanização, expansão da cadeia produtiva e também estratégias de produção mais eficientes, têm sido fatores para estimular o desenvolvimento da produção de pescado (Naylor *et al.*, 2000; FAO, 2016). Segundo a FAO (2016), com o crescimento produtivo, o consumo *per capita* mundial cresceu de 9,9 kg em 1960 para 19,7 kg em 2013, tendo um crescimento anual médio de 3,2%. No ano de 2011 cerca de 60% dos estoques foram considerados esgotados (FAO, 2016). A produção de peixes oriundas do extrativismo estagnou no final da década de 2010, ficando em torno de 90 milhões de toneladas/ano. A partir de 1990 foram criadas políticas públicas de recuperação, na tentativa de reduzir o impacto dessa atividade nos estoques naturais, em destaque à política pública está o estímulo à aquicultura (Worm *et al.*, 2009).

O Brasil apresenta características positivas ao desenvolvimento da atividade, com uma rica ictiofauna brasileira de água doce (Godinho, 2007). Algumas características das espécies nativas, tais como, alto rendimento de filé, qualidade da carne e aceitação no mercado consumidor, aumentam o interesse para a criação em cativeiro (Zaniboni-Filho, 2000; Godinho, 2007; Baldisseroto, 2010). De acordo com Godinho (2007) o Brasil dispõe de uma fauna de peixes de água doce mais diversificada do mundo, no entanto somente 1,5% das espécies nativas são cultivadas. Entre as espécies cultivadas as de destaque são o pirarucu (*Arapaima gigas*), matrinxãs (*Brycon* spp.), tambaqui (*Colossoma macropomum*), piaus (*Leporinus* spp.), dourados (*Salminus* spp.), jundiá (*Rhamdia quelen*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e surubins (*Pseudoplatystoma* spp.) (Godinho, 2007; Baldisseroto, 2010; Campeche *et al.*, 2011), um dos pontos críticos é a larvicultura obtendo baixa sobrevivência, sendo doenças e problemas sanitários uma das causas.

O pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) vem se destacando entre os peixes nativos, visto que sua reprodução em cativeiro assim como o seu manejo é relativamente fácil. Desta forma, a espécie vem sendo estudada para a viabilidade do cultivo comercial, sendo importante o estabelecimento de um pacote tecnológico que consiste em dominar os manejos como reprodução, larvicultura e engorda, assim como, manejo alimentar, nutricional e sanitário próprio para a espécie (Campeche, 2011).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Pacamã

A piscicultura é uma das áreas de produção animal que mais cresce no cenário mundial (Rocha et al., 2013). O Brasil apresenta características positivas para o desenvolvimento da atividade como a disponibilidade de recursos hídricos e a diversidade de sua fauna de peixes, sendo classificadas aproximadamente 2.587 espécies (Buckup et al., 2007). De acordo com Godinho (2007) o Brasil dispõe de uma fauna de peixes de água doce mais diversificada do mundo, no entanto somente 1,5% das espécies são cultivadas. Existem oito bacias hidrográficas brasileiras e entre elas se destaca a do rio São Francisco, terceira maior em extensão, sendo subdividida nos segmentos alto, médio, submédio e baixo (Amorim et al., 2013).

O cultivo de espécies nativas tem provocado interesse, por fazer parte de um mercado que atinge os melhores preços de venda (Crescêncio, 2005), existem espécies como o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) (Steindachner, 1876) (Figura 1) que sofrem redução dos estoques naturais pela forte pressão da pesca e através da Portaria nº445 de 17 de dezembro de 2014, tem seu status de conservação como vulnerável (Costa et al., 2015).

O pacamã é um peixe siluriforme, pertencente à família *Pseudopimelodidae* que reúne os peixes de couro, mais conhecidos como bagres, sendo nativo da bacia do rio São Francisco (Fowler, 1951; Travassos, 1959,1960; Shibata, 2003). É também conhecido por outros nomes como niquim, cururu, peixe-sapo e pacamão.

Essa espécie possui hábito alimentar carnívoro, considerado um “predador de emboscada”, de comportamento noturno, com preferência por ambientes lênticos de fundo de pedras ou areia (Travassos, 1959). A fêmea possui desova parcelada e estas ocorrem em locais arenosos onde o macho os fecunda possuindo cuidado parental. (Godinho, 2003; Barros et al., 2007; Costa et al., 2015).

Em condições de cativeiro, a reprodução pode ser controlada com a manipulação da temperatura, podendo ocorrer durante o ano todo com taxas de eclosão podendo chegar a 95% (Costa et al., 2015). Está entre os bagres de interesse na aquicultura por possuir valor comercial e qualidade da carne sendo esta firme, branca e saborosa, sem espinhos intramusculares.

Por responder bem ao manejo reprodutivo em cativeiro (Godinho, 2003; Costa et al., 2015) é possível realizar programas de repovoamento com bons resultados (Sato et al., 2005) além de viabilizar o cultivo de forma comercial. Outra vantagem da espécie é a

facilidade em aceitar o alimento inerte tornando mais fácil sua manipulação em tanques de criação (Kitagawa et al., 2015).

A espécie vem sendo estudada nos últimos anos para determinação de um pacote tecnológico que viabilize sua produção em cativeiro. Entre os estudos podemos citar os efeitos da salinidade e concentrações de presas na larvicultura (Santos e Luz, 2009); desova induzida e variáveis reprodutivas (Santos et al., 2013); relação proteína:carboidrato no desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (Figueiredo et al., 2014); os efeitos da temperatura da água e das concentrações de presas no seu desenvolvimento inicial (Takata et al., 2014); a captura, adaptação e controle artificial da reprodução (Costa et al., 2015); o comportamento alimentar e efeito do fotoperíodo sobre o desempenho e parâmetros hematológicos (Kitagawa et al., 2015); uso da tricaina como anestésico para larvas e juvenis (Ribeiro et al., 2015); emprego da gelatina em substituição do coração bovino no treinamento alimentar (Salaro et al., 2015); a morfologia externa durante as etapas precoce de desenvolvimento (Assega et al., 2016); os efeitos da cor do ambiente sobre o crescimento, metabolismo, fisiologia e pigmentação da pele (Costa et al., 2017); efeitos da temperatura no crescimento, sobrevivência e parâmetros fisiológicos em juvenis (Costa et al., 2016); digestibilidade de ingredientes em dietas para juvenis (Melo et al., 2016), entre outros trabalhos já realizados.

Apesar desses numerosos estudos, trabalhos relacionados à sanidade desses animais ainda são escassos, tornando-se essencial o incremento de pesquisas para o desenvolvimento de manejos mais adequados para a espécie.

Em sistemas intensivos existe uma preocupação com relação ao aparecimento de patógenos e, principalmente, à disseminação de doenças, causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas. Existem vários desinfetantes químicos que podem ser utilizados na aquicultura, sendo o formol o que está entre os mais aplicados na produção intensiva (Leal et al., 2016).





**Figura 1:** Pacamã *Lophiosilurus alexandri*. **Fonte:** Cristiano Campos Mattioli.

## 2.2 Uso do formol

Os parasitos têm relevância econômica nas pisciculturas e têm sido uma preocupação cada vez maior. Desta forma, diversos métodos profiláticos e terapêuticos em diferentes fases de desenvolvimento dos peixes, vêm sendo testados (Pavanelli et al., 2008; Araújo et al., 2009a, b; Benites De Padua et al., 2014; Mackay et al., 2014). Estudos nessa área são importantes para impedir o uso indiscriminado de produtos que podem causar danos ao ambiente, intoxicação, estresse e até mesmo mortalidades, trazendo prejuízos financeiros ao produtor (Sanches et al., 2007; Pavanelli et al., 2008; Cyrino et al., 2010; Feng et al., 2014).

Tratamentos terapêuticos e profiláticos com produtos químicos são geralmente administrados por meio de banhos e uso de rações medicadas contra parasitas (Corral, 2014). Os tratamentos por meio de banho são os mais utilizados, podendo ser realizados durante o transporte de peixes evitando uma manipulação excessiva (Park, et al., 2014). Existem várias formas de aplicação como os banhos de curta duração que usam concentrações elevadas com duração em torno de 5 minutos. Já banhos de média duração utilizam-se baixas concentrações com durações de 30 a 60 minutos e em banhos longos as concentrações são baixas e permanecem no ambiente entre 8 a 12 horas (Pavanelli et al., 2008; Schalch et al., 2009; Picón-Camacho et al., 2012).

A dissolução do formaldeído (metanol) na água atinge um equilíbrio rápido e quase completo com o hidrato correspondente, conhecido também como formol, sua forma mais utilizada é em solução aquosa podendo chegar de 37 a 40% em peso de formaldeído por peso de água, e é a forma disponível para comercialização (Leal et al., 2016). Para evitar que a formação de paraformaldeído, substância muito tóxica para os peixes e que apresenta uma precipitação branca, deve-se armazenar em local escuro a temperaturas

acima de 4°C. Essa solução também é estabilizada em 10-15% de metanol em peso para evitar assim a formação de paraformaldeído.

O formol é um dos compostos mais utilizados na aquicultura intensiva (Boyd & McNevin, 2015) e está na lista da Food and Drugs Administration (FDA) nos Estados Unidos, como um medicamento de uso aprovado para o controle de fungos, protozoários e parasitos externos (FDA, 1998). Ele é empregado como antifúngico e antiparasitário na forma aquosa (Rach et al. 1997), agindo contra fungos em ovos de peixes, parasitas de brânquias, pele e nadadeiras, sendo efetivo contra a maioria dos protozoários e trematódeos monogenéticos (Pironet e Jones, 2000; Fajer-Ávila et al., 2003; Pahor-Filho et al., 2012; Andrade-Porto et al., 2017). Com a sua característica eletrofílica, o formol é capaz de reagir com grupos funcionais de várias macromoléculas biológicas, tais como proteínas, DNA e RNA, polissacáridos e glicoproteínas (Fox et al., 1985; McDonnell & Russell, 1999; Kiernan 2000). Ele possui elevada reatividade química com compostos biológicos (Kitamoto & Maeda, 1980, Fox et al, 1985, Nilsen et al, 1992). As reações com proteínas e com DNA e RNA para inativar microorganismos ocorrem pela reação com aminoácidos e ácidos nucleicos.

Um aspecto positivo no uso deste produto é que o formol é muito solúvel em água e não se espera uma bioacumulação em organismos aquáticos pelo seu baixo coeficiente de partição n-octanol/água (Who, 1989). Porém por possuir uma rápida taxa de oxidação os níveis de oxigênio da água podem diminuir, porém isso pode ser resolvido com o uso de aeradores na hora do tratamento (Leal et al., 2016).

Além da sua função antifúngica e antiparasitária, ele possui característica fixadora, sendo o mais utilizado para fixação de tecidos. Ele age de modo definitivo, fixando as estruturas citológicas e histológicas das células e tecidos, ou seja, evita a degradação do material em decorrência de fenômenos autolíticos e permite a realização de inúmeras técnicas citológicas e histopatológicas (Greer, 1991; Mies, 1998).

O uso do formol pode causar estresse aos animais (Araújo et al., 2004) e lesões nas brânquias (Keck & Blanc, 2002). Em juvenis de tainha (*Mugil liza*) tratadas com diferentes concentrações de formol, Pahor-Filho et al. (2015) observaram que 135 mg L<sup>-1</sup>, apesar de eficaz contra as espécies de monogenóides mostrada por estes autores, causa hiperplasia leve nas brânquias das tainhas tratadas.

O formol é uma substância tóxica, muito irritante para pele e mucosas, com isso, devem ser tomadas medidas para garantir que o trato respiratório, bem como a pele e os olhos, de qualquer pessoa que manipule o produto não sejam expostos (EFSA, 2014).

Apesar do formol ser constantemente utilizado no tratamento de parasitas, estudos específicos são fundamentais para verificar a segurança do produto e definir quais concentrações são menos prejudiciais à saúde da espécie a ser tratada e, mesmo sendo terapêutico, todos os produtos podem apresentar alguma toxicidade afetando o desenvolvimento e levando a morte dos animais (Andrade et al., 2005; Harikrishnan et al., 2010). Para isso se faz necessário os testes de toxicidade, uma ferramenta importante para se obter conhecimento do nível de segurança do formol para cada espécie que não cause risco a homeostase do animal.

### **2.3 Teste de toxicidade**

Obter conhecimento sobre a toxicidade de um produto para os peixes de cultivo é tão importante quanto saber a eficácia de determinado produto contra determinado parasito. Para o uso do formol, os efeitos podem ser determinados e controlados por testes de toxicidade conduzidos em laboratório, que irão fornecer a dose ideal para tratamento que não prejudique a saúde da espécie a ser tratada (Andrade et al., 2005; Harikrishnan et al., 2010; Veltman, et al., 2014).

Os testes de toxicidade podem ser agudos ou crônicos. Estes são aplicados para identificar e avaliar a capacidade do agente tóxico em gerar efeitos danosos nos organismos vivos (CETESB, 1999). Os estudos de toxicidade aguda definem os efeitos tóxicos de uma substância quando aplicada, normalmente em várias concentrações, em um curto período de tempo. Neste tipo de teste as doses são crescentes com o objetivo de encontrar qual a concentração mais alta que não cause efeitos tóxicos, e também níveis de concentração onde a toxicidade intermediária e grave aconteçam (Allen et al., 2013; Metcalf e Eddy, 2015).

A toxicidade e os efeitos subletais podem se dar pela ação de vários fatores que podem estar relacionados ao ambiente, como temperatura, além de fatores relacionados ao organismo, por exemplo, espécie, idade e peso, entre outros (Ferreira, 2004; Veltman et al., 2014). Os resultados do teste de toxicidade aguda podem ser expressos em concentração letal em que 50% da população de animais morre (CL50). Durante este teste podem ser avaliados a mortalidade ou sobrevivência dos organismos, assim como a imobilidade (Bertolleti, 2001). Após os testes de CL50 utiliza-se o fator de aplicação de 0,1 mensurada para o organismo-teste, onde os valores estimados são considerados níveis de segurança. O nível de segurança é uma concentração presumivelmente inofensiva e, se respeitada, tenderia à redução da perda de organismos em função de um determinado tóxico (Sprague, 1971).

Além dessas análises, pode-se utilizar outras para identificar o efeito tóxico que a substância pode gerar nos animais, sendo o uso de biomarcadores uma ferramenta que pode ajudar nessa avaliação, estando entre eles os marcadores fisiológicos e histológicos (Farmen et al., 2012).

## **2.4 Brânquias**

Entre os biomarcadores, também podem ser utilizados os bioquímicos, moleculares e histológicos (Stephens et al. 1997; Bernet et al. 1999; Simonato et al. 2008). A histologia é um método rápido, prático e rotineiro para identificar o efeito de diferentes poluentes em vários tecidos e órgãos dos peixes (Bernet et al., 1999).

A histopatologia representa marcadores de lesões qualitativas e quantitativas em função da duração e da intensidade da exposição ao elemento tóxico e a capacidade adaptativa de um determinado tecido (Ferreira, 2004). As alterações podem ser determinadas através da verificação e quantificação da morfologia e função celular, atividade de proliferação, eliminação de substâncias como secreções glandulares, assim como o bloqueio da atividade celular podendo atingir a degeneração e a morte celular (Hawkins et al., 2015).

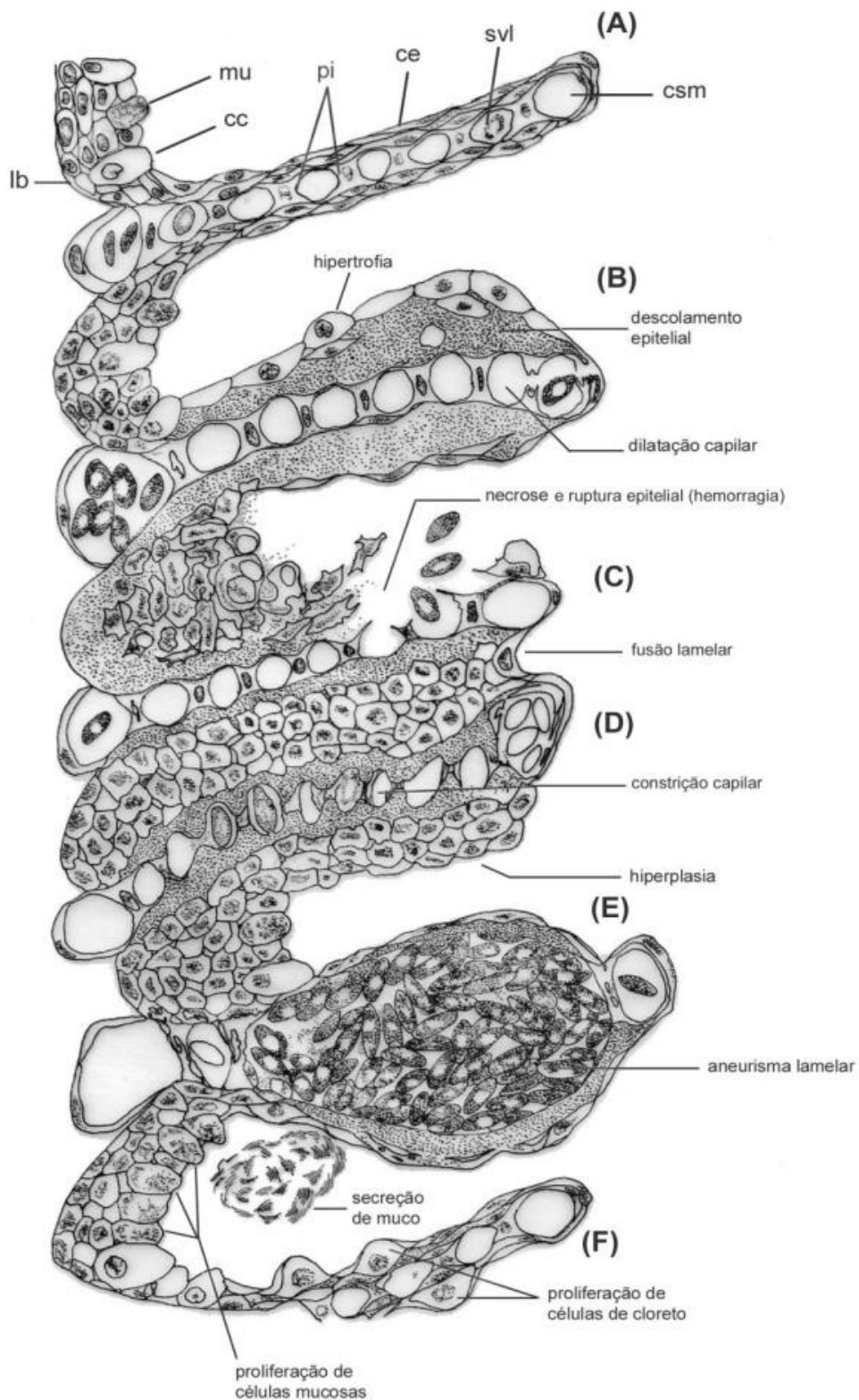
As brânquias são consideradas o principal órgão respiratório dos peixes e possuem grande área de superfície de contato com o meio aquático (Shiogiri et al., 2012). Assim, tornam-se susceptíveis a qualquer mudança que nele ocorra. Elas participam de funções metabólicas vitais para os peixes, tais como respiração, osmorregulação e excreção de amônia (Moyle & Cech Jr. 1988). Porém elas têm a capacidade regenerativa, podendo se restabelecer quando a causa do problema for cessado. As brânquias são compostas por estruturas chamadas de filamentos branquiais, neles encontramos um conjunto de lamelas que representam a superfície funcional respiratória pela qual o oxigênio é absorvido e transmitido para o sangue (Park et al., 2014). Cada filamento branquial possui duas artérias, um vaso aferente que vai do arco branquial até a região apical do filamento e um vaso eferente que retorna o sangue para o arco (Pough et al., 2008).

Alterações nos níveis biológicos, que consistem em teciduais e sistêmicos, são indícios de danos que os quimioterápicos podem causar. Existem inúmeros tipos de alterações que são regularmente observadas em estudos de toxicidade. Podemos citar os edemas, hiperplasia epitelial das lamelas secundárias, infiltração de células epiteliais, fusão lamelar, proliferação e hipersecreção de células mucosas (Machado, 1999; Leonardo et al., 2001). As alterações como o descolamento epitelial, hipertofia

e hiperplasia, são respostas compensatórias do tecido branquial para diminuir o contato indireto e direto com os agentes químicos presentes no meio aquático (Nogueira et al., 2008). Algumas das possíveis alterações podem ser observadas na figura 2.

Smith e Piper, (1972) avaliaram brânquias de truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas ao formol e encontram que a concentração de 200 mg L<sup>-1</sup>, durante 1 hora, provocou separação epitelial nas brânquias, assim como em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em banhos de 250 mg L<sup>-1</sup> durante o mesmo tempo, também causaram lesões severas como hiperplasia e separação do epitélio respiratório (Perera e Pathiratne, 2005). Pahor-Filho et al., (2015) avaliaram brânquias de juvenis de tainha (*Mugil liza*) expostos ao formol e encontraram nas concentrações de 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> hiperplasia moderada, além de desprendimento do epitélio.

As brânquias de peixes possuem contato direto com o agente tóxico quando presente na água. Esse órgão é indicado para avaliar as alterações de ação tóxica aguda ou crônica de substâncias estressoras (Bernet et al., 1999; Lins et al., 2010).



**Figura 2:** Desenho esquemático de lesões branquiais comuns induzidas por compostos tóxicos. (A: estado normal; B, C, D, E e F: alterados). Abreviações: lb: lâmina basal; cc: célula de cloreto; mu: célula mucosa; pi: célula pilar; ce: célula epitelial lamelar; svl: seio venoso lamelar; csm: canal sanguíneo marginal. Adaptado de Machado et al. (1999). **Fonte:** Stella Rubim, 2017.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a toxicidade aguda, alterações patológicas e nível de segurança terapêutica do formol em larvas e juvenis de pacamã.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar a CL50 em 12 horas nas fases iniciais de vida do pacamã.
- Caracterizar as alterações patológicas induzidas pelo formol nas brânquias.
- Calcular o nível de segurança terapêutica do formol para larvas e juvenis de pacamã.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Desenvolvimento e processo de aprovação de novos medicamentos: toxicologia. In: **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. Santa Catarina: Caroline Vieira, p. 26-66, 2013.

AMORIM, P. L.; GIONGO, P. BELEI, F.; SAMPAIO, W. M. S. **Caracterização da ictiofauna do rio Santa Catarina (Bacia do São Francisco) no município de Vazante, Minas Gerais**. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, v. 4, n. 1, p. 14-21, 2013.

ANDRADE, R. L. B.; ANDRADE, L. S.; BOSCOLO, W. R. et al. **Comportamento, sobrevivência e desenvolvimento de lebistes, *Poecillia reticulata*, submetidos a agentes utilizados na profilaxia de doenças**. *Acta Scientiarum Animal Science*, v.27, n. 4, p.523-528, 2005.

ANDRADE-PORTO, S. M.; AFFONSO, E. G.; KOCHHANN, D. et al. **Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae)**. *Aquaculture*, v.479, p.38-44, 2017.

ARAÚJO, L. D.; CHAGAS, E. C.; GOMES, L. C.; BRANDÃO, F. R. **Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.3, p.217-221, 2004.

ARAÚJO, C. S.; GOMES, A. L.; TAVARES-DIAS, M. et al. **Parasitic infections in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimatidae) kept in a semi-intensives fish farm**. Central Amazon, Brazil. *Veterinarski Arhiv*, v. 79, n.5, p.99-507, 2009a.

ARAÚJO, C. S.; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A. L. et al. **Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no Estado do Amazonas, Brasil**. In: Tavares-Dias, M. (Ed.) **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. EMBRAPA. Amapá, Macapá, p.389-424, 2009b.

ASSEGA, F. M.; BIRINDELLI, J. L. O.; BIALETZKI, A.; SHIBATTA, O. A. **External morphology of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 during early stages of**



development, and its implications for the evolution of Pseudopimelodidae (Siluriformes). *PLOS ONE.*, v.11., 2016.

BALDISSEROTO, B. e GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** 2ª edição. Santa Maria: *Editora da UFSM.* 352p, 2010.

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

BENITES DE PADUA, S.; TOMAS JERÔNIMO, G.; MAYUMI ISHIKAWA, M. et al. **Parasitological assessment and host-parasite relationship in farmed cachara catfish fingerlings (*Pseudoplatystoma reticulatum* Eigenmann & Eigenmann, 1889).** Mato Grosso do Sul, Brazil. *Neotropical Helminthology*, v.8, n.1, p.37-45, 2014.

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

BERTOLLETI, E. Ecotoxicologia aquática. In: MAIA, N. B.; MARTOS, H. L.; BARRELA, W. **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações.** São Paulo: EDUC. 219-228p, 2001.

BOYD C., MCNEVIN A. **Aquaculture, Resource Use, and the Environment.** John Wiley & Sons, New Jersey, 2015.

BRASIL, Presidência da República. PR: **Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca.** LEI Nº 11.959, DE 29 DE JUNHO DE 2009. Brasília. 2009.

BUCKUP, P. A., MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. (Eds). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil.** Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007, 195p.

CAMPECHE, D. F. B.; BALZANA, L.; FIGUEIREDO, R. C. R. et al. **Peixes Nativos do Rio São Francisco Adaptados para Cultivo,** EMBRAPA, p.20, 2011.

CETESB. **Companhia de Saneamento Ambiental. Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos.** São Paulo, p. 149, 1999.

CORRAL, A. C. T. **Uso do óleo essencial de Piper aduncum na ração para o controle de nematóides de pirarucu (*Arapaima gigas*, Schinz 1822).** Dissertação de Mestrado, Universidade Nilton Lins/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 69pp, 2014.

COSTA, D. C.; SILVA, W.S.; FILHO, R.M. et al. **Capture, adaptation, and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species.** *Animal Reproduction Science*, v.159, p.148-154, 2015.

COSTA, D. C.; MATTIOLI, C. C.; SILVA, W. S. et al. **The effect of environmental colour on the growth, metabolism, physiology and skin pigmentation of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*.** *Journal of Fish Biology*, v.90, p.922–935, 2017.

COSTA, P. C.; LEME, F. O. P.; TAKATA, R. et al. **Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish.** *Aquaculture Research*, v.47, p.1706-1715, 2016.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Eds.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: Editora UFSM, 2005, p. 23-36.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y. et al. **A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.68-87, 2010.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), 2014. **Scientific Opinion on the safety and efficacy of formaldehyde for all animal species based on a dossier submitted by Regal BV.** *EFSA Journal* 2014, v.12, n.2, p.3561, 24 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3561

FAJER-ÁVILA, E. J.; PARRA, I. A.; AGUILAR-ZARATE, G. et al. **Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites.** *Aquaculture*, v.223, p.41-50, 2003.

FAO SOFIA. The state of world fisheries and aquaculture Report, United Nations Food and Agriculture Organization, Rome 2016.

FARMEN, E.; MIKKELSEN, H. N.; EVENSEN, O. et al. **Acute and sub-lethal effects in juvenile Atlantic salmon exposed to low µg/L concentrations of Ag nanoparticles.** *Aquatic Toxicology*, v.108, p.78-84, 2012.

FDA (Food and Drug Administration) **Certain other dosage form new animal drugs; formalin solution.** *Code of Federal Regulations*, 21 CFR Part 529.1030, June 18, 1998.

FENG, M. B.; QU, R.; LI, Y. et al. **Biochemical biomarkers in liver and gill tissues of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to hexabromobenzene.** *Environmental Toxicology*, v.29, n.12, p.1460-1470, 2014.

FERREIRA, C. M. **Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática.** In: Ranzani-Paiva, M. J. T.; Takemoto, R. M.; Lizama, M. de los A. P. (org). *Sanidade de organismos aquáticos*, Varela, São Paulo, Brasil. p.273-284, 2004.

FIGUEIREDO, R. A. C. R.; SOUZA, R. C.; BEZERRA, K. S. et al. **Relação proteína: carboidrato no desempenho e metabolismo de juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.66, p.1567-1576, 2014.

FOWLER, H. W. **Os peixes de água doce do Brasil.** *Arquivos de Zoologia*. São Paulo, v.6, p.1-625, 1951.

FOX C. H., JOHNSON F. B., WHITING J. et al. **Formaldehyde fixation.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 33 n.8, p. 845–853, 1985.

GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Eds). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais.** Belo Horizonte: PUC Minas. p.229-274, 2003.

GODINHO, H. P. **Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.3, p.351-360, 2007.

GREER, C. E.; PETERSON, N. B.; KIVIAT et al. **PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Effect of fixative and fixation time.** *American Journal of Clinical Pathology*, v.95, p. 117-124, 1991.

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. **Scuticociliatosis and its recent prophylactic measures in aquaculture with special reference to South Korea Taxonomy, diversity and diagnosis of scuticociliatosis: Part I Control strategies of scuticociliatosis: Part II.** *Fish and Shellfish Immunology*, v.29, n.1, p.15-31, 2010.

HAWKINS, A. D.; THORNTON, C.; KENNEDY, A. J. et al. **Gill histopathologies following exposure to nanosilver or silver nitrate.** *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v.78, n.5, p.301-315, 2015.

IBAMA; **Estatísticas da Pesca-Brasil, Grandes regiões e unidades da Federação,** Brasília, 147p., 2007.

KECK, N.; BLANC, G. **Effects of formalin chemotherapeutic treatments on biofilter efficiency in a marine recirculating fish farming system.** *Aquatic Living Resources*, v.15, p.361–370, 2002.

KIERNAN, J. A. **Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do.** *Microscopy Today*, v.01, p.8–12, 2000.

KITAGAWA, A. T.; COSTA, L. S.; PAULINO, R. R. et al. **Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*).** *Applied Animal Behaviour Science*, v.171, p.211-218, 2015.

KITAMOTO, Y.; MAEDA H. **Reevaluation of the reaction of formaldehyde at low concentration with amino acids.** *Journal of Biochemistry*, v.87, n.5, p.1519–1530, 1980.

LEAL, J. F.; NEVES, M. G. P. M. S.; SANTOS, E. B. H. et al. **Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality.** *Reviews in Aquaculture*, p.1-15, 2016.

LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. et al. **Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C.** *Acta Scientiarum*, v.23, n.4, p.863-870, 2001.

LINS, J. A. P. N.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S. et al. **Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático.** *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v.8, p.469-484, 2010.

MACHADO, M. R. **Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas.** *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, v.1, p.63-76, 1999.

MACKAY, D.; MCCARTY, L. S.; ARNOT, J. A. **Relationships between exposure and dose in aquatic toxicity tests for organic chemicals.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.33, n.9, p.2038-2046, 2014.

MCDONNELL G., RUSSELL A. D. **Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.1, p.147, 1999.

MELO, K. D. M.; OLIVEIRA, G. R.; BRITO, T. S. et al. **Digestibilidade de ingredientes em dietas para juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.51, p.785-788, 2016.

METCALF, L.; EDDY, H. P. Características do esgoto: Toxicidade. In: **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos.** São Paulo: *MCGRAW-HILL BRASIL*, p.158-165, 2015.

MIES, C. **Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues.** *Human Pathology*, v.25, p.555-560, 1994.

MOYLE, P. B.; CECH Jr. J. J. **Fishes – an introduction to ichthyology**. 2nd ed. Prentice-Hall, *Englewood Cliffs*, New Jersey. 559 p, 1988.

NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, H. J. et al. **Effect of aquaculture on world fish supplies**. *Nature*, v.405, p.1017-1024, 2000.

NILSEN, H.; LILLEHAUG, A.; TAKSDAL T.; NORDMO R. **Toxicity of intraperitoneally injected formalin in Atlantic Salmon, *Salmon-Salar L.*** *Journal of Fish Diseases*, v.15, n.4, p.323–329, 1992.

NOGUEIRA, D. J.; CASTRO, S. C.; RIGOLIN-SÁ, O. **Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas-MG**. *Revista Brasileira de Zootecias*, v.11, p.227-232, 2008.

OSTRENSKY, A.; BORGUETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília. 276p., 2008.

PAHOR-FILHO, E.; MIRANDA-FILHO, K. C.; JÚNIOR, J. P. **Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host**. *Aquaculture*, v.354–355 p.111–116, 2012.

PAHOR-FILHO, E.; MIRANDA-FILHO, K. C.; KLOSTERHOFF, M. et al. **Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes)**. *Aquaculture Research*, v.46, p.3040–3045, 2015.

PARK, S. B.; JANG, H. B.; FAGUTAO, F. F. et al. **Combination treatment against scuticociliatosis by reducing the inhibitor effect of mucus in olive flounder *Paralichthy solivaceus***. *Fish and Shellfish Immunology*, v.38, n.2, p.282-286, 2014.

PAVANELLI, G.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá, Paraná, Brasil, p.311, 2008.

PERERA, H. A. C. C.; PATHIRATNE, A. **Effects of short term exposure to therapeutic levels of formalin on health status of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus***. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, v.33, p.239-245, 2005.

PICÓN-CAMACHO, S. M.; TAYLOR, N. G.; BRON, J. E. et al. **Effects of long duration, low dose bronopol exposure on the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), parasitising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)**. *Veterinary parasitology*, v.186, n.3, p.237-244, 2012.

PIRONET, E. N.; JONES, J. B. **Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian dhufish**. *Aquaculture International*, v.8, p.349-361, 2000.

POUGH, H; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4a Edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda. 684p., 2008.

RACH, J. J.; HOWE, G. E.; SCHREIER, T. M. **Safety of formalin treatments on warm and cool water fish eggs**. *Aquaculture*, v.149, p.183-191, 1997.

RIBEIRO, P. A. P.; MELO, D. C.; SANTO, A. H. E. et al. **Tricaine as anesthetic for larvae and juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous freshwater fish**. *Aquaculture Research*, v.46, p.1788-1792, 2015.

ROCHA, C. M. C.; RESENDE, E. K.; ROUTLEDGE, A. B. et al. **Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 8, p. 4-5, 2013.

SALARO, A. L.; JÚNIOR, J. C.; LIMA, F. W. et al. **Gelatin in replacement of bovine heart in feed training of *Lophiosilurus alexandri* in diferente water salinities**. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.87. p.2281-2287, 2015.

SANCHES, E. G.; OSTINI, S.; RODRIGUES, V. C. S. **Ocorrência e tratamento de monogenoides em alevinos de pampo (*Trachinotus carolinus*) cultivados experimentalmente na região norte do Estado de São Paulo**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.16, n.1, p.1-4, 2007.

SANTOS, H. B.; SAMPAIO, E. V.; ARANTES, F. P. et al. **Induced spawning and reproductive variables of the catsfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae).** *Neotropical Ichthyology*, v.11, p.607-614, 2013.

SANTOS, J. C. E.; LUZ, R. K. **Effect of salinity and prey concentrations of *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture.** *Aquaculture*, v.287, p.324-328, 2009.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; NOGUEIRA, M. G. et al. **A ictiofauna na região do alto São Francisco, com ênfase no reservatório de Três Marias, Minas Gerais.** *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata.* São Carlos: *Rima*, p.251-304, 2005.

SCHALCH, S. H. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. **Principais métodos terapêuticos para peixes em cultivo.** In: Tavares-Dias, M. (Ed.) **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo.** EMBRAPA. Amapá, Macapá. p.575-601, 2009.

SHIBATA, O. A. Family Pseudopimelodidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JÚNIOR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** Porto Alegre: *Edipucrs*, p.401-405, 2003.

SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P. et al. **Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.34, p.388-396, 2012.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. **Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.69, n.1, p.112-120, 2008.

SMITH, C. E.; PIPER R. G. **Pathological effects of formalin treated rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *Fisheries Research - Journal*, v.29, p.328-329, 1972.



SPRAGUE, J. B. **Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects and safe concentrations.** *Water Research*, v.5, p.245-266, 1971.

STEPHENS, S. M.; BROWN, J. A.; FRANKLIN, S. C. **Stress responses of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L., exposed to sub-lethal concentrations of petroleum hydrocarbons.** *Fish Physiology and Biochemistry*, v.17, p.433-439, 1997.

TAKATA, R.; SILVA, W. S.; COSTA, D. C. et al. **Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish.** *Neotropical Ichthyology*, v.12, p.853- 859, 2014.

TRAVASSOS, H. **Nótula sobre o pacamã, *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876.** *Atas da Sociedade de Biologia*, Rio de Janeiro, v.4, n.3, p.1-2, 1959.

TRAVASSOS, H. **Catálogo dos peixes do vale do rio São Francisco.** *Boletim da Sociedade Cearense de Agronomia*, v.1, p.1-66, 1960.

VELTMAN, K.; HENDRIKS, A. J.; HUIJBREGTS, M. A. et al. **Toxicokinetic toxicodynamic (TKTD) modeling of Ag toxicity in freshwater organisms: whole-body sodium loss predicts acute mortality across aquatic species.** *Environmental science & technology*, v.48, n. 24, p.14481-14489, 2014.

WHO (1989) **International Program on Chemical Safety, Environmental Health Criteria** 89: Formaldehyde. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm>. Acesso em 04/09/2017.

WORM, B.; HILBORN, R.; BAUM, et al. **Rebuilding global fisheries.** *Science*, v.325, p.578–585, 2009.

ZANIBONI-FILHO, E. **Larvicultura de peixes de água doce.** *Informe Agropecuário*, v.21 n.203, p.69-77, 2000.

## 5. ARTIGO

**Toxicidade aguda e alterações patológicas nas fases iniciais de *Lophiosilurus alexandri*, um peixe carnívoro de água doce, expostos ao formol**

### Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda, alterações patológicas e nível de segurança terapêutica do formol em larvas e juvenis de *Lophiosilurus alexandri*. Foram realizados três experimentos em diferentes idades. Experimento 1, larvas com 7 dias após a eclosão (DAE) com peso de  $0,021 \pm 0,003$  g foram submetidas as concentrações 43,2, 86,4, 172,8, 345,6, 691,2 e 1404,0 mg L<sup>-1</sup> de formol, além do controle. No experimento 2, juvenis com 22 DAE e peso de  $0,23 \pm 0,03$  g, foram submetidos a concentrações de 54,0, 108,0, 216,0, 432,0 e 648,0 mg L<sup>-1</sup> de formol mais o controle. No experimento 3, juvenis com 45 dias DAE e peso de  $3,75 \pm 0,81$  g foram submetidos as concentrações 86,4, 172,8, 345,6, 691,2 e 1036,8 mg L<sup>-1</sup> de formol e controle. Após as CL50 definidas, foram calculados os níveis de segurança de 1 e 12 horas. Para análises histológicas foi utilizado o método HE. As CL50 de 12 horas foram para experimento 1: 108,86 mg L<sup>-1</sup> com intervalo de confiança (IC) entre 99,06 a 119,63 mg L<sup>-1</sup>; experimento 2: 152,74 mg L<sup>-1</sup> com IC entre 142,62 - 156,18 mg L<sup>-1</sup> e para o experimento 3: 244,38 mg L<sup>-1</sup> e IC entre 224,37 - 251,23 mg L<sup>-1</sup> de formol. Em relação aos níveis de segurança, para o experimento 1 foi encontrado o valor de 66,22 mg L<sup>-1</sup> (1 h) e 10,88 mg L<sup>-1</sup> (12h); no experimento 2 foi de 49,17 mg L<sup>-1</sup> (2h) e 15,27 mg L<sup>-1</sup> (12h) e no experimento 3 foi de 68,89 mg L<sup>-1</sup> (2h) e 24,43 mg L<sup>-1</sup> (12h). Os peixes do experimento 2 expostos a concentrações crescentes de formol apresentaram mais alterações nas brânquias quando comparados aos animais do experimento 3. Os resultados mostram que a idade e estágio de desenvolvimento de *L. alexandri* influencia na sensibilidade dos animais em relação à exposição do formol.

**Palavras chave:** Formalina, toxicidade, peixe nativo, siluriforme.

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the acute toxicity, pathological changes and level of therapeutic safety of formalin in larvae and juveniles of *Lophiosilurus alexandri*. Three experiments were carried out at different ages. Experiment 1, larvae 7 days after hatching (AED) weighing  $0.021 \pm 0.003$  g were subjected to the concentrations 43.2, 86.4, 172.8, 345.6, 691.2 and 1404.0 mg L<sup>-1</sup> of formaldehyde, besides the control. In experiment 2, juveniles with 22 DAE and weight of  $0.23 \pm 0.03$  g were submitted to concentrations of 54.0, 108.0, 216.0, 432.0 and 648.0 mg L<sup>-1</sup> of formaldehyde plus control. In the experiment 3, juveniles with 45 days DAE and with  $3.75 \pm 0.81$  g were considered the concentrations 86.4, 172.8, 345.6, 691.2 and 1036.8 mg L<sup>-1</sup> of formaldehyde and control. After the defined LC50s, safety levels of 1 and 12 hours were calculated. For histological analysis, the HE method was used. The 12-hour LC50s were for experiment 1: 108.86 mg L<sup>-1</sup> with confidence interval (CI) between 99.06 to 119.63 mg L<sup>-1</sup>; Experiment 2: 152.74 mg L<sup>-1</sup> with IC between 142.62 - 156.18 mg L<sup>-1</sup> and for experiment 3: 244.38 mg L<sup>-1</sup> and IC between 224.37 - 251.23 mg L<sup>-1</sup> of formaldehyde. Regarding safety levels, for experiment 1, the value of 66.22 mg L<sup>-1</sup> (1 h) and 10.88 mg L<sup>-1</sup> (12) was found; in experiment 2 it was 49.17 mg L<sup>-1</sup> (2h) and 15.27 mg L<sup>-1</sup> (12h) and in experiment 3 it was 68.89 mg L<sup>-1</sup> (2h) and 24.43 mg L<sup>-1</sup> (12h). Fish from Experiment 2 exposed to increasing concentrations of formaldehyde exhibited more changes in the gills when compared to the animals in Experiment 3. The results show that the age and stage of development of *L. alexandri* influences the sensitivity of the animals to the exposure of formaldehyde.

Key words: Formalin, toxicity, native fish, siluriform.

## 1. Introdução

Uma das fases mais críticas na produção comercial de organismos aquáticos é a larvicultura, onde o desenvolvimento de práticas adequadas é fundamental para o sucesso da produção de determinada espécie. Os estudos para larvicultura e produção intensiva de juvenis de pacamã *Lophiosilurus alexandri* vem mostrando a possibilidade de produção desta espécie. Em condições controladas a reprodução pode ser realizada com sucesso (Costa et al., 2015). Sua larvicultura pode ser realizada em altas densidades de estocagem, até 300 larvas/L durante os primeiros 15 dias de alimentação exógena (Cordeiro et al., 2016). Após esta fase, os juvenis podem ser condicionados ao alimento formulado (Cordeiro et al., 2016) mostrando boa adaptação a manejos com rações extrusada (Kitagawa, 2015), sendo também já iniciado os estudos de nutrição de juvenis (Souza et al., 2013; Souza et al., 2015; Melo et al., 2016).

No entanto, com a intensificação pode ocorrer aumento da incidência de parasitas e doenças infecciosas, tendo como fatores de risco, o estresse, a baixa qualidade da água e falta de boas práticas de manejo (Silva et al., 2013). Os parasitos têm relevância econômica nas pisciculturas, sendo uma grande preocupação, pois peixes infectados acabam sofrendo redução no crescimento, aumento na susceptibilidade a outras doenças e até mesmo ocasionando mortalidades, exigindo cuidados e técnicas de manejo adequadas para o sucesso do cultivo (Fujimoto e Carneiro, 2001).

Existem tratamentos terapêuticos e profiláticos com produtos químicos utilizados por meio de banhos de imersão. Entre estes produtos, cabe destaque para o formol que está na lista da Food and Drugs Administration (FDA) nos Estados Unidos, como um medicamento de uso aprovado para o controle de fungos, protozoários e parasitos externos (FDA, 1998). O formol (37%) demonstra ser um produto eficaz na profilaxia e no tratamento de ectoparasitas de espécies de peixes de ambiente dulcícola (Araújo et al., 2004; Paixão et al., 2013) e marinho (Fajer-Ávila et al., 2003; Katharios et al., 2006; Pahor-Filho et al., 2012). Entretanto, as concentrações sugeridas variam de espécie para espécie. Estudos demonstraram que concentrações entre 100 e 500 ppmil de formol causaram danos nas brânquias de Milkfish (*Chanos chanos*), com aumento da intensidade de acordo com o aumento da concentração (Cruz e Pitogo, 1989). Mudanças comportamentais e morfológicas como hiperemia e exoftalmia foram descritas no peixe Baiacu (*Sphoeroides annulatus*) (Fajer-ávila et al., 2003).

Desta forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar a toxicidade aguda, alterações patológicas e nível de segurança terapêutica do formol para tratamento em larvas e juvenis de *Lophiosilurus alexandri*.

## **2. Material e métodos**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Aquacultura – Laqua, da Escola de Veterinária da UFMG, Brasil e aprovados pela Comissão de ética no uso de animais CEUA –UFMG (49/2017).

### **2.1 Produção de larvas e juvenis**

Para o experimento, foram realizadas desovas de *L. alexandri* proveniente de animais adaptados as condições de laboratório, em tanque de fundo de areia, como descrito por Costa et al. (2015).

Os ovos foram incubados a 28°C com aeração artificial e a eclosão ocorreu 24 horas após a coleta da desova. Após a eclosão os animais permaneceram nestas condições até o início da alimentação exógena.

Para a larvicultura, as larvas com sete dias após a eclosão foram estocadas em tanques circulares montados em sistema de recirculação de água na densidade de 10 larvas/L, com temperatura de 27,5±0,5°C e oxigênio dissolvido > 5 mg L<sup>-1</sup>. A alimentação consistiu no fornecimento de náuplios de artêmia seguindo o protocolo descrito por Cordeiro et al. (2016), durante 15 dias. Após este período, os animais foram submetidos ao condicionamento alimentar seguindo metodologia descrita por (Cordeiro et al., 2016). Após o condicionamento alimentar, os juvenis passaram a ser alimentados com dieta comercial extrusada de 1,2 mm, sendo proteína bruta 45% (mínimo), fibra bruta 4% (máximo), matéria mineral 10% (máximo), lipídeos 7%, cálcio 2%, fósforo 1%.

### **2.2 Testes preliminares de toxicidade aguda do formol**

Para cada fase de desenvolvimento dos animais a ser testada foram realizados testes preliminares com seis concentrações de formol acrescidas do tratamento controle (sem adição de formol), essas concentrações foram baseadas em animais com idades aproximadas a deste estudo. Nesses testes determinou-se o intervalo de concentração de formol que resultou em nenhuma e total mortalidade para uso nos testes definitivos (IBAMA, 1987; APHA, 1991).

### 2.3 Experimento 1

Para este experimento foram utilizadas 140 larvas de *L. alexandri*, antes de iniciar a alimentação exógena (sete dias após eclosão - DAE), com peso médio de  $0,021 \pm 0,003$  g e comprimento médio de  $13,61 \pm 0,78$  mm.

Os animais foram transferidos para 14 béqueres com 600 mL de água com aeração individual e constante (Oxigênio dissolvido:  $6,2 \pm 0,1$  mg L<sup>-1</sup>, Hanna® HI 9146), mantidos em incubadora tipo DBO com controle eletrônico de temperatura ( $27,3 \pm 0,8^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 h. O pH foi mantido em  $8,2 \pm 0,1$  (Hanna® Combo pH & EC). Durante o período experimental de 12 h, as larvas não foram alimentadas.

O experimento foi delineado de forma casualizada com sete tratamentos em duplicata. Foram testadas as seguintes concentrações de formol, sendo elas, controle (sem adição de formol na água), T<sub>43,2</sub> = 43,2 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>86,4</sub> = 86,4 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>172,8</sub> = 172,8 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>345,6</sub> = 345,6 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>691,2</sub> = 691,2 mg L<sup>-1</sup> e T<sub>1404</sub> = 1404,0 mg L<sup>-1</sup>, em sistema estático. Os animais foram submetidos a essas concentrações com formol P.A. 37% - MERCK®.

Para verificação da mortalidade, nas primeiras 4 h foi realizada vistoria das unidades experimentais a cada 5 minutos. Após este período a mortalidade foi verificada a cada hora. Animais eminentes à morte, ou seja, aqueles que não respondiam aos estímulos mecânicos foram retirados e quantificados.

### 2.4 Experimento 2

Neste experimento foram utilizados 120 juvenis de *L. alexandri* após os 15 primeiros dias de alimentação exógena (22 DAE), apresentando peso médio de  $0,23 \pm 0,03$  g e comprimento médio de  $29,62 \pm 1,94$  mm. Durante esta fase os animais receberam somente náuplios de artêmia como alimento.

Antes de iniciar o experimento, os animais foram submetidos a jejum de 12 h. Após o jejum, os animais foram transferidos para 12 béqueres com volume de 600 mL, com aeração individual e constante (Oxigênio dissolvido  $6,4 \pm 0,2$  mg L<sup>-1</sup>), mantidos em incubadora tipo DBO com controle eletrônico de temperatura ( $28,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo (12 h), pH mantido em  $8,2 \pm 0,2$ . Durante o período experimental de 12 horas de observações não houve alimentação.

O experimento foi delineado de forma casualizada com seis tratamentos em duplicata. Foram testadas as seguintes concentrações de formol, a saber: Controle (sem adição de formol na água) T<sub>54</sub> = 54,0 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>108</sub> = 108,0 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>216</sub> = 216,0 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>432</sub> = 432,0 mg L<sup>-1</sup> e T<sub>648</sub> = 648,0 mg L<sup>-1</sup>, em sistema estático. Os animais foram submetidos a essas concentrações com formol P.A. 37% - MERCK®.

As observações de mortalidade seguem os procedimentos descritos no experimento 1.

### 2.5 Experimento 3

Para este experimento foram utilizados 120 juvenis de *L. alexandri* com peso médio de  $3,75 \pm 0,81$  g e comprimento médio de  $66,61 \pm 5,45$  mm, (45 DAE). Estes animais foram submetidos ao condicionamento alimentar e estavam se alimentando de dieta comercial extrusada.

Antes do início do experimento os animais foram submetidos a jejum de 12 h. Após o jejum, os juvenis foram transferidos para 12 tanques com volume útil de nove litros com aeração individual e constante (Oxigênio dissolvido de  $6,2 \pm 0,1$  mg L<sup>-1</sup>), fotoperíodo de 12 horas e estes foram mantidos em banho termostático para controle da temperatura ( $29,3 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ), além do pH mantido em  $8,4 \pm 0,2$ . Durante as observações, com duração de 12 horas, os animais não foram alimentados.

O experimento foi delineado de forma casualizada com seis tratamentos em duplicata. Foram testadas as seguintes concentrações de formol, a saber: Controle (sem adição de formol na água), T<sub>86,4</sub>= 86,4 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>172,8</sub>= 172,8 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>345,6</sub>= 345,6 mg L<sup>-1</sup>, T<sub>691,2</sub>= 691,2 mg L<sup>-1</sup> e T<sub>1036,8</sub>= 1036,8 mg L<sup>-1</sup>, em sistema estático. Os animais foram submetidos a essas concentrações com formol P.A. 37% - MERCK®.

As observações de mortalidade seguem os procedimentos descritos no experimento 1.

### 2.6 Nível de segurança

Após a realização dos experimentos, com os valores de CL50 foi calculado os níveis de segurança segundo Sprague (1971), sendo aplicado o fator de 0,1 a cada CL50 encontrada.

### 2.7 Análise histopatológica

Seis animais foram coletados ao longo das observações de mortalidade nos experimentos 1, 2 e 3, estes foram fixados em boiun por 12 horas à temperatura ambiente como descrito por Luna (1968). Em seguida, foram incluídas em parafina para microtomia obtendo-se cortes histológicos de 5 µm em lâminas de vidro e corados por meio da técnica hematoxilina/eosina. As amostras foram observadas em microscópio Nikon eclipse E 200 e as imagens capturadas por meio de câmera Leica DFC 500



acoplada em microscópio óptico Leica DM 4000 B. Para avaliação das brânquias, sempre foram avaliados o segundo arco branquial do lado direito dos animais.

Os seis animais coletados foram utilizados para as alterações patológicas que foram classificadas descritivamente de acordo com Romano e Cueva (1988) e Randi et al. (1996) como leve, quando a alteração afeta menos da metade da área analisada; moderada, quando a alteração afeta mais da metade da área analisada; severa, quando a alteração afeta toda a área analisada.

As brânquias também foram avaliadas semi-quantitativamente pelo grau de alteração da brânquia. Para tal, usou-se o cálculo DTC (grau de alteração do tecido), que se baseia na gravidade das lesões, adaptado de Abdel-Moneim et al. (2012), Bernet et al. (1999) e Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). Para o cálculo do DTC, as alterações em cada órgão foram classificadas em estágio I, que não prejudicam o funcionamento normal do tecido; estágio II, alterações mais graves comparadas ao estágio I, que afetam o funcionamento normal do tecido; e estágio III, alterações muito graves que causam danos irreparáveis ao tecido, conforme tabela 1.

**Tabela 1:** Alterações histopatológicas de brânquias, assim como seus estágios de severidade ao tecido.

<b>Lesão</b>	<b>Estágio</b>
Hiperplasia do epitélio branquial	I
Fusão lamelar	I
Desprendimento do epitélio branquial	I
Desorganização lamelar	I
Telangiectasia	II
Ruptura do epitélio lamelar	II
Fusão lamelar completa	II
Necrose	III

\* Adaptado de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), Bernet et al. (1999) e Abdel-Moneim et al. (2012).

Após análise das alterações em cada tratamento, foi calculado um valor de DTC para cada animal seguindo a fórmula:

$$DTC = (1 \times EI) + (10 \times EII) + (100 \times EIII),$$

Onde EI, EII e EIII refere-se ao número de alterações dos estágios I, II e III, nessa ordem. Os valores de DTC entre 0 e 10 indicam o funcionamento normal do órgão; Entre

11 e 20 indicam danos leves ao órgão; Entre 21 e 50 constituem mudanças moderadas no órgão; Valores entre 51 e 100 indicam lesões graves e valores acima de 100 apontam dano irreversível ao órgão.

## 2.8 Análises estatísticas

A fim de estimar a concentração letal (CL50) e os intervalos de confiança (95%) foi utilizado o programa “Trimmed Spearman Karber method” (Hamilton et al., 1977). Os dados de DTC para o experimento 2 e 3 foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ( $\alpha=0,05$ ) post hoc Student Newman – Keuls (5%).

## 3. Resultados

### 3.1 Experimento 1

Após 12 horas de exposição aguda ao formol não foi verificada mortalidade no controle e na concentração  $T_{43,2}$ . Na concentração  $T_{86,4}$  registrou-se 16,6% de mortalidade, enquanto nos tratamentos  $T_{172,8}$ ;  $T_{345,6}$ ;  $T_{691,2}$  e  $T_{1404}$  esta foi de 100%.

A CL50 de 1 e 12 horas pode ser observada na tabela 2, assim como o nível de segurança.

**Tabela 2:** Concentrações letais (CL50) e níveis de segurança de formol estimadas de acordo com o registro de mortalidades ao longo de 12 h de exposição para *Lophiosilurus alexandri* com sete dias pós eclosão.

Horas	Intervalo de confiança		Nível de segurança
	CL50 (mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )*
1	662,21	583,33 - 751,75	66,22
12	108,86	99,06 - 119,63	10,88

\* Nível de segurança segundo Sprague (1971). Multiplica-se o fator 0,1 ao valor da CL50 de 1 e 12 horas.

Neste experimento não foi possível a realização de análise das alterações patológicas das brânquias, devido a fase de desenvolvimento dos animais, em que as brânquias ainda estavam em formação.

### 3.2 Experimento 2

No controle e nas concentrações T<sub>54</sub> e T<sub>108</sub> não foram registradas mortalidades. Nas concentrações T<sub>216</sub>, T<sub>432</sub> e T<sub>648</sub> foram registradas 100% de mortalidade. As CL50 de 1 e 12 horas foram estimadas, assim como os níveis de segurança (Tabela 3).

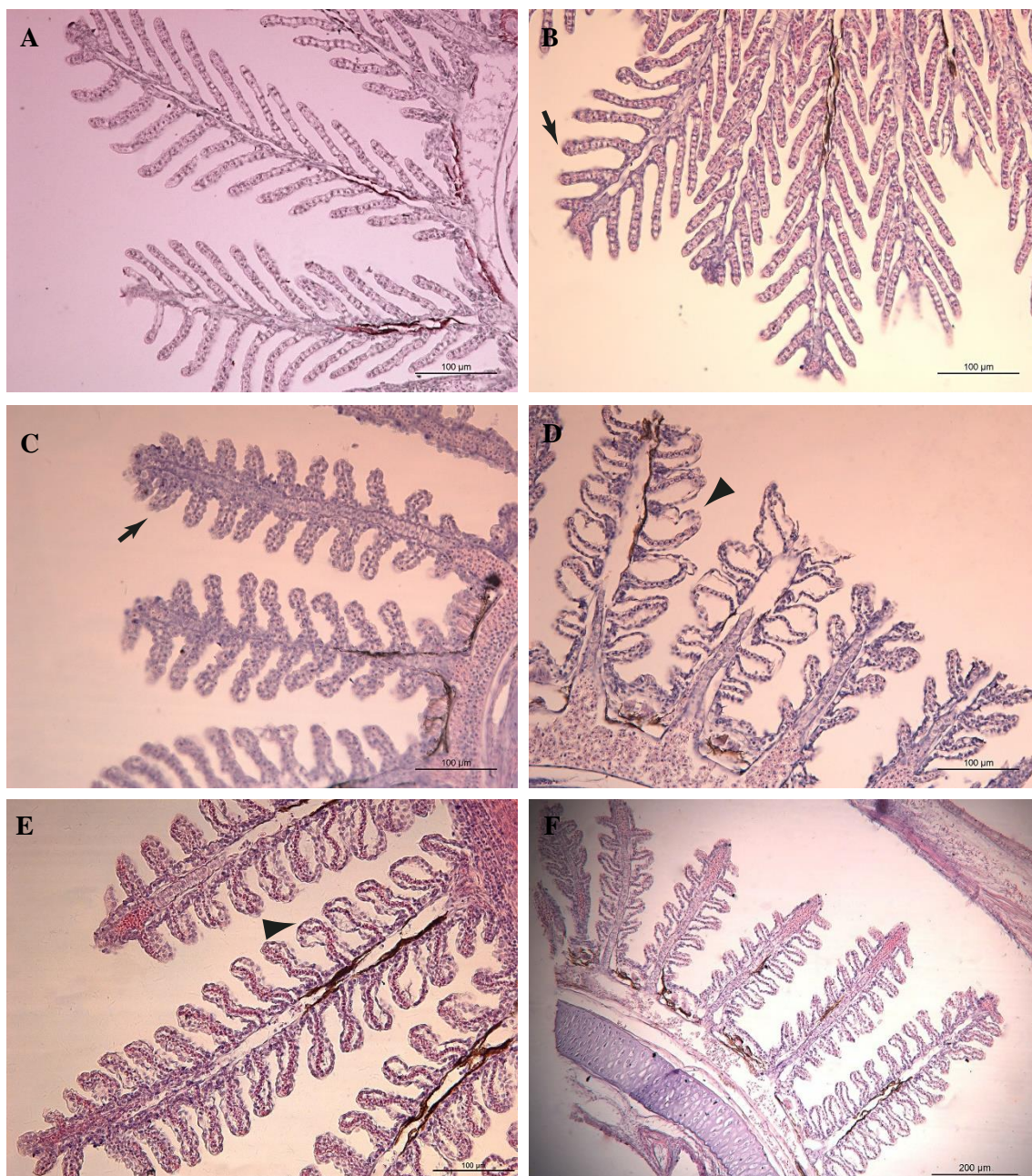
**Tabela 3:** Concentrações letais (CL50) e níveis de segurança de formol estimadas de acordo com o registro de mortalidades ao longo de 12 h de exposição para *Lophiosilurus alexandri* 22 dias pós eclosão.

Horas	CL50 (mg L <sup>-1</sup> )	Intervalo de confiança	Nível de segurança
		(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )*
1	-	-	
2	491,72	459,31 - 526,42	49,17
12	152,74	142,62 - 156,18	15,27

\* Nível de segurança segundo Sprague (1971). Multiplica-se o fator 0,1 ao valor da CL50 de 1 e 12 horas.

As alterações patológicas das brânquias de juvenis de *L. alexandri* são apresentadas na figura 1. A análise de T<sub>108</sub> não foi realizada, devido a perda do material. As brânquias no grupo controle apresentaram hiperplasias leves com desprendimentos de epitélio pontuais e em sua maioria não apresentaram alterações (Figura 1A). No tratamento T<sub>54</sub>, as brânquias apresentaram hiperplasia nas lamelas secundárias variando de leve à moderada, desprendimento de epitélio leve e telangiectasias pontuais (Figura 1B). Brânquias expostas ao tratamento T<sub>216</sub> apresentaram hiperplasia nas lamelas secundárias de moderada a severa com desprendimentos de epitélio leve a moderado (Figura 1C). O tratamento T<sub>432</sub> apresentou maior frequência de desprendimento do epitélio de moderado a severo, com hiperplasias nas lamelas secundárias de nível moderado (Figura 1D). No tratamento T<sub>648</sub> foram observados desprendimento do epitélio severo e hiperplasia severa nas lamelas secundárias (Figura 1E).

Os valores calculados de DTC para brânquias foram: controle =  $1,0 \pm 0,7$ ; T<sub>54</sub> =  $1,5 \pm 0,5$ ; T<sub>216</sub> =  $6,5 \pm 5,5$ ; T<sub>432</sub> =  $8,8 \pm 8,4$ ; T<sub>648</sub> =  $10,8 \pm 8,1$  e foram semelhantes entre os tratamentos (P>0,05).



**Figura 3:** Fotomicrografias de brânquias de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* expostos ao formol. (A) Grupo controle. (B) Tratamento 54 mg L<sup>-1</sup> de formol: Hiperplasias leves (setas). (C) 216 mg L<sup>-1</sup> de formol: hiperplasias moderadas (setas). (D) 432 mg L<sup>-1</sup> de formol: Desprendimentos do epitélio de moderado a severo (ponta de seta). (E) 648 mg L<sup>-1</sup> de formol: Desprendimento do epitélio severo com hiperplasias (ponta de seta). Aumento de 20x; barra de 100 μm (F) 648 mg L<sup>-1</sup> de formol: Imagem panorâmica dos filamentos branquiais (aumento de 10x; barra 200 μm), coloração HE.

### 3.3 Experimento 3

Não houve mortalidade no controle e nos tratamentos T<sub>86,4</sub> e T<sub>172,8</sub>. Para T<sub>345,6</sub>, T<sub>691,2</sub> e T<sub>1036,8</sub> a mortalidade foi de 100% após 12 horas.

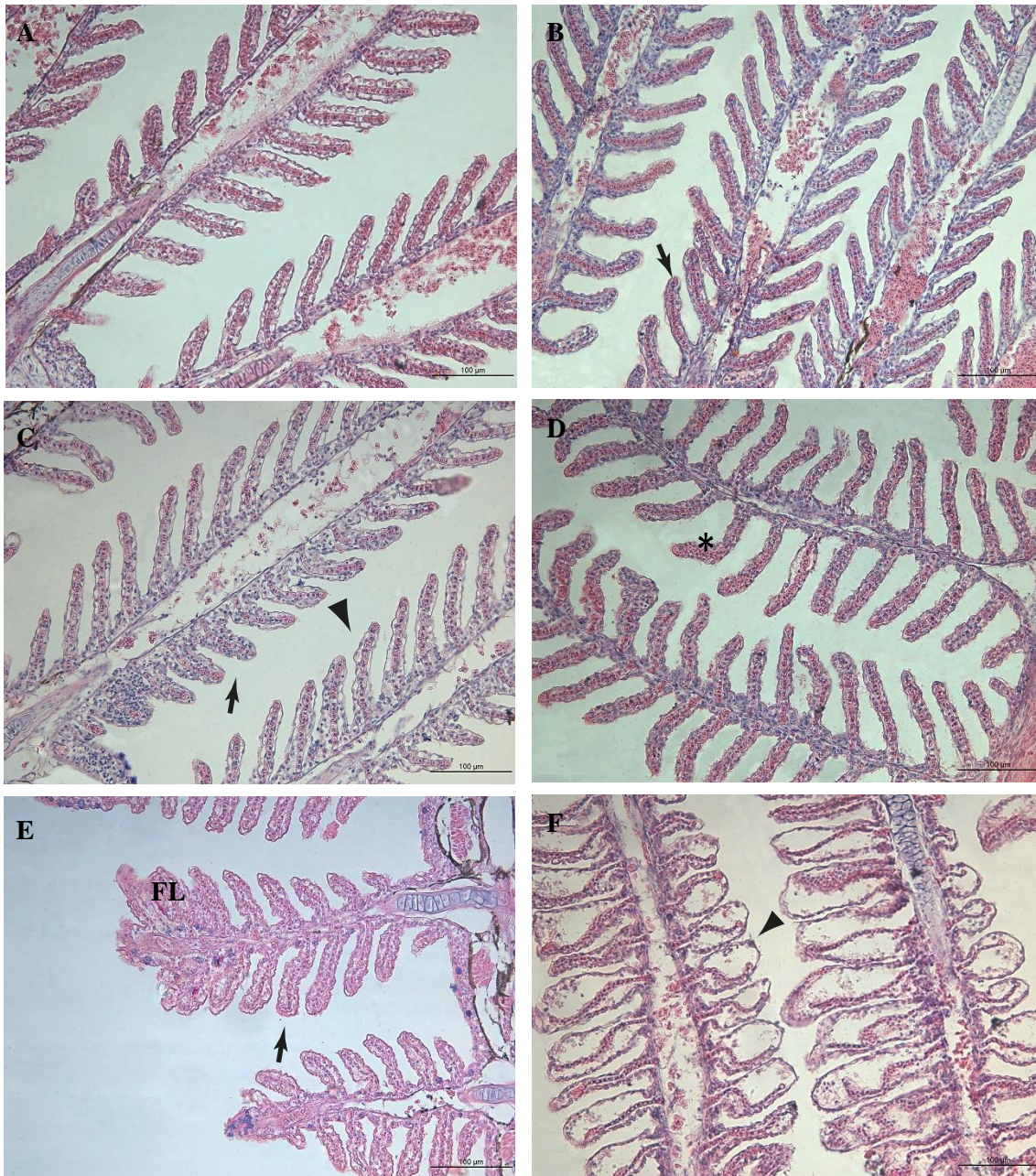
A tabela 4 mostra as CL50 estimadas para 1 e 12 horas, assim como os níveis de segurança.

**Tabela 4:** Concentrações letais (CL50) e níveis de segurança de formol estimadas de acordo com o registro de mortalidades ao longo de 12 h de exposição para *Lophiosilurus alexandri* 45 dias pós eclosão.

Horas	CL50 (mg L <sup>-1</sup> )	Intervalo de confiança	Nível de segurança
		(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )*
1	-	-	
2	688,95	618,07 - 767,96	68,89
12	244,38	224,37 - 251,23	24,43

\* Nível de segurança segundo Sprague (1971). Multiplica-se o fator 0,1 ao valor da CL50 de 1 e 12 horas.

As alterações de brânquias expostas ao formol durante o experimento 3 são demonstradas na figura 2. As brânquias do grupo controle apresentaram hiperplasias leves nas lamelas secundárias e em sua maioria sem alteração (Figura 2A). Em T<sub>86,4</sub> e T<sub>172,8</sub> foi verificado hiperplasias das lamelas secundárias e alguns desprendimentos do epitélio branquial (Figura 2B e 2C, respectivamente). Para T<sub>345,6</sub> registrou-se hiperplasias nas lamelas secundárias de leve a moderada, alguns desprendimentos do epitélio, início de fusão e desorganizações lamelares pontuais (Figura 2D). Em T<sub>691,2</sub> pôde-se observar desorganização lamelar, hiperplasias seguidas de começo de fusão lamelar com desprendimentos do epitélio (Figura 2E). No tratamento T<sub>1036,8</sub> foram verificados desprendimentos do epitélio, hiperplasias de moderada a severa, como consequência da fusão lamelar, desorganização lamelar e telangiectasias (Figura 2F).



**Figura 4:** Fotomicrografias de brânquias de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* expostos ao formol. (A) Grupo controle. (B) Tratamento 86,4 mg L<sup>-1</sup> de formol: Hiperplasias leves (seta). (C) 172,8 mg L<sup>-1</sup> de formol: hiperplasias leves (seta) e alguns desprendimentos do epitélio (ponta de seta). (D) 345,6 mg L<sup>-1</sup> de formol: Hiperplasias de leve a moderada (seta) e desorganizações lamelares (\*). (E) 691,2 mg L<sup>-1</sup> de formol: Hiperplasias (seta) seguidas de começo de fusão lamelar (FL). (F) 10368 mg L<sup>-1</sup> de formol: Desprendimentos do epitélio severo nas lamelas (ponta de seta). (Aumento de 20x; barra de 100 µm), coloração HE.

O DTC para juvenis de *L. alexandri* submetidos à concentração de T<sub>1036,8</sub> foi maior em relação ao controle, T<sub>86,4</sub> e T<sub>172,8</sub>; porém, semelhante as concentrações T<sub>345,6</sub> e T<sub>691,2</sub> (Tabela 5).

**Tabela 5:** Grau de alteração (DTC) das brânquias de juvenis de *Lophiosilurus alexandri* com 45 dias pós eclosão, submetidos a diferentes concentrações de formol no experimento 3.

Tratamento (mg L <sup>-1</sup> de formol)	DTC (média ± DP)
Controle	0,75 ± 0,4 <sup>a</sup>
T <sub>86,4</sub>	1,3 ± 0,4 <sup>a</sup>
T <sub>172,8</sub>	1,5 ± 0,9 <sup>a</sup>
T <sub>345,6</sub>	1,8 ± 0,8 <sup>ab</sup>
T <sub>691,2</sub>	1,8 ± 0,8 <sup>ab</sup>
T <sub>1036,8</sub>	8,3 ± 5,3 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística, Student-Newman-Keuls ( $\alpha=0,05$ ).

#### 4. Discussão

No presente estudo a tolerância a diferentes concentrações de formol aumentou com o desenvolvimento dos animais, com concentrações de CL<sub>50-12h</sub> de 108 mg L<sup>-1</sup> nas larvas com 7 DAE e CL<sub>50-12h</sub> de 244 mg L<sup>-1</sup> para animais com 45 DAE. A menor tolerância em larvas com 7 dias após a eclosão pode ser devido a estas ainda não apresentarem o aparelho branquial completamente formado (Guimarães-Cruz, 2009). Este fato indica a ausência de mecanismos para reação frente a agressão causada pelo formol. Os animais com 22 dias após a eclosão, apesar de já possuírem o aparelho branquial formado apresentaram mais lesões do que os animais com 45 DAE, mesmo esses últimos tendo uma maior concentração de CL<sub>50</sub>. Este fato sugere mecanismos mais avançados que consigam proteger as brânquias da irritação causada pelo formol com o desenvolvimento dos animais ainda que não estejam completamente desenvolvidos mesmo 22 dias após a eclosão.

No experimento 1 foi encontrado nível de segurança de 66,22 mg L<sup>-1</sup> em 1 h e 10,88 mg L<sup>-1</sup> em 12 horas. Já para os experimentos 2 e 3 não houve CL<sub>50</sub> após 1 h de

exposição. Os níveis de segurança para os animais do experimento 2 foi de 49,17 mg L<sup>-1</sup> de formol em 2h e 15,27 mg L<sup>-1</sup> de formol em 12h. Já os animais do experimento 3 apresentaram nível de segurança de 68,89 mg L<sup>-1</sup> de formol em 2 h e 24,43 mg L<sup>-1</sup> de formol em 12 h. Esses resultados mostram que os níveis de segurança para duas horas de banho nos animais com 45 DAE foi superior aos animais do experimento 2. De acordo com Sprague (1971), o nível de segurança é uma concentração possivelmente inofensiva e, se respeitada, poderia reduzir a perda de organismos em função de um determinado tóxico.

A recomendação da aplicação de formol em banhos de imersão é de 170 a 250 mg L<sup>-1</sup> durante 1 hora para controlar protozoários e fungos em peixes teleósteos (FDA, 1998). No entanto, este documento não deixa claro se estas doses são baseadas em CL50 ou nível de segurança. Quando comparadas estas concentrações aos resultados de CL50 do presente estudo verifica-se elevada sensibilidade das larvas de *L. alexandri*, uma vez que a concentração de 172,8 mg L<sup>-1</sup> (experimento 1) e de 216 mg L<sup>-1</sup> (experimento 2) causaram 100% de mortalidade nas 12 horas. Porém, no experimento 3 a concentração aproximada do mínimo recomendado (172,8 mg L<sup>-1</sup>) não causou nenhuma mortalidade, indicando uma maior resistência. Os resultados do presente trabalho ressaltam a necessidade de estudos para as diferentes fases de desenvolvimento dos peixes para recomendações de banhos com formol. Macniven e Litle (2001) mostraram que juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pesando 0,15 ± 0,04 g obtiveram uma CL50 de 429,6 mg L<sup>-1</sup> de formol. Esses resultados foram próximos aos verificados no presente estudo em juvenis de *L. alexandri* pesando 0,23 ± 0,03 g onde a CL50 de 2 horas foi de 491,72 mg L<sup>-1</sup> de formol. Porém, para juvenis de tainha (*Mugil platanus*) com 1,0 ± 0,26 g a CL50 de 1 hora foi de 317,73 mg L<sup>-1</sup> (Pahor-Filho et al., 2012), mostrando que os valores de CL50 mudam de acordo com o grau de sensibilidade em diferentes espécies de peixe (Prestes et al., 2013).

As alterações patológicas das brânquias são frequentemente utilizadas como biomarcadores ambientais em estudos de toxicidade em peixes, pois revelam através da severidade das lesões, a sanidade dos organismos, podendo também verificar o grau de comprometimento dos tecidos (Carraschi et al., 2012; Santos et al., 2012; Reddy e Rawat, 2013). No presente estudo os banhos de imersão em formol provocaram diversas alterações na morfologia das brânquias de *L. alexandri*. Vários trabalhos já relataram desprendimento epitelial, hiperplasia e telangiectasia causados pelo formol em diferentes espécies de peixes (Smith e Piper, 1972; Cruz e Pitogo, 1989; Perera e Pathiratne, 2005;



Carneiro et al., 2006; Pahor Filho et al., 2015). A concentração de 54 mg L<sup>-1</sup> (experimento 2) e as de 86,4 e 172,8 mg L<sup>-1</sup> de formol (experimento 3), obtiveram as mesmas alterações, como, hiperplasia nas lamelas secundárias consideradas de leve a moderada e desprendimento do epitélio leve. A concentração de 216 mg L<sup>-1</sup> no experimento 2, ocasionou hiperplasia nas lamelas secundárias de moderada a severa com desprendimentos do epitélio leve a moderado. As alterações foram mais intensas que as observadas na concentração 345,6 mg L<sup>-1</sup> de formol durante o experimento 3, onde registrou-se hiperplasias nas lamelas secundárias de leve a moderada além de alguns desprendimentos do epitélio. Contudo, ao comparar com a maior concentração do experimento 2 de 648 mg L<sup>-1</sup> de formol verificou-se, desprendimento do epitélio e hiperplasias severas nas lamelas secundárias, enquanto a concentração de 691,2 mg L<sup>-1</sup> (experimento 3) hiperplasias seguidas de começo de fusão lamelar com desprendimentos do epitélio, mostrando alterações semelhantes ao do experimento 2.

Quando comparado a outras espécies, juvenis de tilápias *Oreochromis niloticus* expostos a banhos de 250 mg L<sup>-1</sup> de formol durante 1 h, tiveram lesões severas como hiperplasia e desprendimento do epitélio respiratório (Perera e Pathiratne, 2005). Em juvenis de tainha *M. liza* expostos 67,5 mg L<sup>-1</sup> de formol, Pahor Filho et al. (2015) observaram lesões como hiperplasia leve e suave desprendimento do epitélio. Smith e Piper (1972) relataram que em truta arco íris *Oncorhynchus mykiss* expostas a concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> de formol durante 1 hora também provocaram desprendimento epitelial nas brânquias. Essas alterações são semelhantes às verificadas no presente estudo, porém com maior ou menor severidade em função do tamanho dos animais e das concentrações testadas, sendo que a alteração mais frequentemente observada em *L. alexandri* foi o desprendimento epitelial, cuja frequência foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações de formol independente da idade. O desprendimento do epitélio observado nas brânquias dos peixes submetidos ao formol é uma resposta inicial do aparelho branquial quando ocorre o aumento das funções das células e dos tecidos causado pela alteração das atividades fisiológicas dos animais (Smart, 1976). Essa alteração é um mecanismo característico da defesa das brânquias que favorecem o aumento da barreira água-sangue, com esta perda da superfície respiratória a consequência pode ser morte por anóxia (Thophon et al., 2003). Segundo Bernet et al. (1999) o desprendimento do epitélio é uma alteração regressiva, sendo sua finalidade reduzir funcionalmente o órgão atingido, e deste modo, diminuir a contaminação do animal pela substância tóxica.

Além do desprendimento do epitélio, hiperplasias também foram encontradas em *L. alexandri*. A hiperplasia é um mecanismo de defesa do animal, onde o epitélio se espessa pelo aumento do número de células epiteliais ocorrendo a diminuição da superfície, reduzindo a entrada de toxinas como também a eficiência respiratória podendo causar danos ao animal e levar a morte quando a exposição continua ao longo do tempo (Cengiz, 2006; Roberts, 2012).

Os valores calculados de DTC para brânquias no experimento 2 foram semelhantes entre os tratamentos variando de 1 a 10, devido às variações nas alterações branquiais dos animais com 22 DAE. Contudo o maior valor verificado no experimento 2 superou o DTC de 8,3 registrado no experimento 3 para a maior concentração de formol testada. Mesmo com essas diferenças o DTC nos experimentos 2 e 3 demonstraram que as alterações observadas nos animais expostos ao formol, não prejudicaram o funcionamento normal do órgão (DTC  $0 < 10$ ). Outro fator que pode explicar esses valores é o caráter fixador do formol, que apesar de ter causado as lesões pode ter impedido a ocorrência de mais alterações por fixar os tecidos branquiais. Estes resultados reforçam que com o desenvolvimento dos animais os mecanismos de resposta das brânquias ao formol são mais eficientes para os juvenis com 45 dias pós eclosão comparado aos animais com 7 e 22 dias pós eclosão.

## 5. Conclusão

A idade e estágio de desenvolvimento de *Lophiosilurus alexandri* influencia na sensibilidade dos animais em relação à exposição ao formol. As análises histopatológicas de brânquias mostraram alterações irritativas em maior grau em animais mais jovens e com valores de DTC abaixo de 10 sugerindo funcionamento normal das brânquias.

## 6. Referências bibliográficas

Abdel-Moneim, A. M.; Al-Kahtani, M. A.; Elmenshawy, O. M. **Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia.** *Chemosphere*. v.88, p.1028–1035, 2012. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.001.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for examination of water and wastewater.** 17th ed. Washington, p. 81-143, 1991.

Araújo, L. D.; Chagas, E. C.; Gomes, L. C.; Brandão, F. R. **Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.3, p.217-221, 2004. DOI: 10.1590/S0100-204X2004000300003.

Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W. et al. **Histopathology in fish: a proposal for a protocol to assess aquatic pollution.** *Journal of Fish Diseases*. v.22, p.25–34, 1999. DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.

Carneiro, P. C. F.; Cirio, S. M.; Schorer, M. **Estudo anatomopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por *Ichthyophthirius multifiliis* e submetidos a tratamentos convencionais.** *Archives of Veterinary Science*, v. 11, p. 33-38, 2006. DOI: 10.5380/avs.v11i1.5620.

Carraschi, S. P.; Cruz, C.; Machado Neto, J. G. et al. **Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics.** *Ecotoxicology and environmental safety*, v.83, p.115-120, 2012. DOI: 10.1016 / j.ecoenv.2012.06.016.

Cengiz E. I. **Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 22, p. 200–204, 2006. DOI: 10.1016 / j.etap.2006.03.006.

Cordeiro, N. I. S.; Costa, D. C.; Silva, W. de S. et al. **High stocking density during larviculture and effect of size and diet on production of juvenile *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae).** *Journal Applied Ichthyology*. v.32, p.61–66, 2016. DOI: 10.1111 / jai.12963.

Costa, D. C.; Silva, W. de S.; Filho, R. M. et al. **Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species.** *Animal Reproduction Science*, v.159, p.148–154, 2015. DOI: 10.1016 / j.anireprosci.2015.06.009.

Cruz, E. R.; Pitogo, C. L. **Tolerance level and histopathological response of milkfish (*Chanos chanos*) fingerlings to formalin.** *Aquaculture*, v.78, p.135–145, 1989. DOI: 10.1016 / 0044-8486 (89) 90027-6

Fajer-Ávila, E. J.; Parra, I. A.; Aguilar-Zarate, G. et al. **Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites.** *Aquaculture*, v.223, p.41-50, 2003. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00166-2.

FDA (Food and Drug Administration) **Certain other dosage form new animal drugs; formalin solution.** *Code of Federal Regulations*, 21 CFR Part 529.1030, June18, 1998.

Fujimoto, R. Y.; Carneiro, D. J. **Adição de ascorbil polifosfato como fonte de vitamina C em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829).** *Acta Scientiarum, Maringá*, v.23, n.4, p.855-861, 2001.

Godinho, H. P.; Godinho, A. L. (Eds). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais.** Belo Horizonte: PUC Minas. p.229-274, 2003.

Griffin, B. R.; Davis, K. B.; Darwish, A.; Straus, D. L. **Effect of exposure to potassium permanganate on stress indicators in channel catfish *Ictalurus punctatus*.** *Journal of the World Aquaculture Society*, v.33, p.1-9, 2002. DOI: 10.1111/j.17497345.2002.tb00472.x.

Guimarães-Cruz, R. J.; Santos, J. E.; Sato, Y.; Veloso-Júnior, V. C. **Early development stages of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Pisces: Pseudopimelodidae) from the São Francisco River basin, Brazil.** *Journal of Applied Ichthyology*, v.25, p.321–327, 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2008.01153.x.

Kabata, Z. **Parasites and diseases of fish cultured in the tropics.** London: Taylor e Francis. 318p 1985.

Katharios, P.; Papandroulakis, N.; Divanach, P. **Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths**

**with formalin and mebendazole.** *Aquaculture*, v.251, n.2, p.167-171, 2006. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.046.

Kitagawa, A. T.; Costa, L. S.; Paulino, R. R. et al. **Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*).** *Applied Animal Behaviour Science*, v.171, p.211–218, 2015. DOI: 10.1016/j.applanim.2015.08.025.

López, C. M.; Sampaio, E. V. **Sobrevivência e crescimento larval do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes, Pimelodidae), em função de três densidades de estocagem em laboratório.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v.22, p.491-494, 2000.

Luz, R. K.; Santos J. C. E. **Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, p.903-909, 2008. DOI: 10.1590/S0100-204X2008000700015.

Macniven, A. M.; Little, D. C. **Development and evaluation of a stress challenge testing methodology for assessment of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linn.) fry quality.** *Aquaculture Research*, v. 32, p. 671–679, 2001. DOI: 10.1046/j.13652109.2001.00574.x.

Melillo - Filho, R.; Takata, R.; Santos, A. E. H. et al. **Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish.** *Aquaculture Research*, v.45, p.1913–1920, 2014. DOI: 10.1111/are.12139.

Melo, K. D. M.; de Oliveira, G. R.; de Brito, T. S. et al. **Digestibilidade de ingredientes em dietas juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.51, n.6, p.785-788, 2016. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000600012.

Pahor-Filho, E.; Filho, K. C. M.; Joaber, P. J. **Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host.** *Aquaculture*, v.354, p.111-116, 2012. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.03.032.

PaHOR-FILHO, E.; FILHO, K. C. M.; KLOSTERHOFF, M. et al. **Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes).** *Aquaculture Research*, v.46, p.3040–3045, 2015. DOI: 10.1111/are.12462.

Paixão, L. F.; Santos, R. F. B.; Ramos, F. M.; Fujimoto, R. Y. **Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus* sp. (Osteichthyes: Characidae).** *Acta Amazonica*, v.43, n.2, p.211-216, 2013. DOI: 10.1590/S0044-59672013000200012.

Pavanelli, G. C.; Eiras, J. C.; Takemoto, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento.** Maringá: Ed. da Universidade Estadual de Maringá. 264p., 1998.

Perera, H. A. C. C.; Pathiratne, A. **Effects of short term exposure to therapeutic levels of formalin on health status of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*.** *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, v.33, p.239-245, 2005.

Poleksic, V.; Mitrovic-Tutundzic, V. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution.** In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.), *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish.* *Fishing News Books*, Oxford, p.339– 352, 1994.

Prestes, E. B.; Clemente, Z.; Castro, V. L. S. S.; Jonsson, C.M. **Avaliação da Toxicidade Aguda de Piraclostrobin, Epoxiconazole sua Mistura em *Colossoma macropomum* (tambaqui).** *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, v.8, n.1, p.125-128, 2013. DOI: 10.5132/eec.2013.01.016.

Reddy, P. B.; Rawat, S. S. **Assessment of aquatic pollution using histopathology in fish as a protocol.** *International Research Journal of Environmental Sciences*, v.2, n.2, p.79-82, 2013.

Roberts R. J. **Fish Pathology.** *Wiley-Blackwell*, Oxford, UK, 592p., 2012.

Santos, R. F. B.; Dias, H. M.; Fujimoto, R. Y. **Acute toxicity and histopathology in ornamental fish amazon bluespotted corydora (*Corydoras melanistius*) exposed to**

**formalin.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.84, n.4, p.1001-1007, 2012. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00166-2.

Silva, R. M.; Tavares-Dias, M.; Dias, M. W. R. et al. **Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.48, n.8, p.1049-1057, 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000800034.

Smart, G. **The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *Journal of Fish Biology*, v.8, p.471-475, 1976. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1976.tb03990.x.

Smith, C. E. e Piper R. G. **Pathological effects of formalin treated rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *Journal Fisheries Research*, v.29, p.328-329, 1972. DOI: 10.1139 / f72-053.

Souza, M. G.; Seabra, A. G. L.; Silva, L. C. R. et al. **Exigência de proteína bruta para juvenis de pacamã.** *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.14, n.2, p.362-370, 2013. DOI:10.1590/S151999402013000200011.

Souza, A. M.; Melo, J. F. B.; Moreira, E. M. S. et al. **The effect of mango waste meal in the protein:carbohydrate ratio on performance and body composition of pacamã fish (*Lophiosilurus alexandri*).** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.67, n.2, p.527-534, 2015. DOI: 10.1590/1678-7170.

Sprague, J.B. **Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects and safe concentrations.** *Water Research*, v.5, p.245-266, 1971.

Thophon, S.; M. Kruatrachue, E. S.; Upatham, P. et al. **Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure.** *Environmental pollution*. v.121, p.307-320, 2003. DOI: 10.1016/S0269-7491(02)00270-1.

Walker, C. H. **Biochemical biomarkers in ecotoxicology-some recent developments.** *The Science of the Environment*, v.171, n.1-3, p.189-95, 1995. DOI: 10.1016/0048-9697(95)04720-6.

## **6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esta pesquisa abordou questões relevantes quanto aos testes de toxicidade aguda em pacamãs mostrando que a idade influencia na tolerância dos animais ao formol e indicaram que concentrações subletais não apresentam alterações no tecido branquial. Porém, revela que animais menores possuem mais alterações patológicas. As alterações sugerem ativação de mecanismos compensatórios do pacamã expostos ao formol.

## **7.0 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Sugerimos estudos futuros com a realização de testes *in vivo* para validação da eficácia e do uso terapêutico do formol contra ectoparasitas que acometem peixes.

Monitoramento da depleção residual do formol no peixe e na água durante os bioensaios de toxicidade aguda ou crônica.