

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

LEONARDO DEMIER CARDOSO

**EFEITO DA IVERMECTINA E DO TRICLORFONE EM BANHO TERAPÊUTICO
PARA ACARÁ-BANDEIRA (*Pterophyllum scalare*, LICHTENSTEIN, 1823)
PARASITADOS POR *Clinostomum complanatum***

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2017

LEONARDO DEMIER CARDOSO

**EFEITO DA IVERMECTINA E DO TRICLORFONE EM BANHO TERAPÊUTICO
PARA ACARÁ-BANDEIRA (*Pterophyllum scalare*, LICHTENSTEIN, 1823)
PARASITADOS POR *Clinostomum complanatum***

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de produção, reprodução e saúde animal.

Orientador: Manuel Vazquez Vidal Júnior

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

073/2017

C268 Cardoso, Leonardo Demier.

Efeito da ivermectina e do triclorfone em banho terapêutico para acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*, Lichtenstein, 1823) parasitados por *Clinostomum complanatum* / Leonardo Demier Cardoso – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

82 f. : il.

Bibliografia: f. 68 – 82.

Tese (Doutorado em em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Área de Concentração: Produção, Reprodução e Saúde Animal.

Orientador: Manuel Vazquez Vidal Júnior.

1. Metacercária. 2. Metrifonato. 3. Zoonose. 4. Peixe Ornamental. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

639.3

LEONARDO DEMIER CARDOSO

**EFEITO DA IVERMECTINA E DO TRICLORFONE EM BANHO TERAPÊUTICO
PARA ACARÁ-BANDEIRA (*Pterophyllum scalare*, LICHTENSTEIN, 1823)
PARASITADOS POR *Clinostomum complanatum***

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na área de concentração de produção, reprodução e saúde animal.

Aprovada em 09 de outubro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Shaytner Campos Duarte (Doutor, Ciência animal) – FMC

Prof.º Douglas da Cruz Mattos (Doutor, Ciência animal) – IFES

Prof.º Dálcio Ricardo de Andrade (Doutor, Morfologia) – UENF

Prof.º Manuel Vazquez Vidal Júnior (Doutor, Zootecnia) – UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, investimento e confiança em mim depositados.

À Maria Aparecida, minha namorada, que além do companheirismo, ajudou na execução do trabalho.

Agradeço em memória ao meu pai e minha avó, que apesar de não estarem fisicamente presentes, possuem responsabilidade sobre minha formação moral e dessa forma, norteiam minhas tomadas de decisão.

Ao professor Manuel Vazquez e ao professor Dálcio pela orientação, conselhos e pela paciência.

À técnica de laboratório Viviane pela grande ajuda no processamento do material histopatológico.

Às professoras Louisiane e Jankerle por autorizarem a utilização do laboratório e equipamentos indispensáveis para a realização das análises histopatológicas.

Ao professor Leonardo Trivilin pela ajuda com a análise estatística.

À professora Isabela pela ajuda com a identificação parasitológica no trabalho.

Ao professor Clóvis Santos pela ajuda com seus conhecimentos de parasitologia.

Ao professor Shaytner Duarte e a toda banca de avaliação pelas considerações e correções da tese.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao programa de pós-graduação em ciência animal pela oportunidade de aprendizado e condições de execução do projeto.

Às secretárias do programa de pós-graduação Jovana e Conceição, que exercem suas funções com maestria, auxiliando com boa vontade os pós-graduandos.

À CAPES pelo auxílio financeiro através de bolsa de estudo durante o período de doutorado.

A todos os companheiros de laboratório.

Aos amigos pelo apoio e ajuda nos momentos de necessidade. Em especial, Lucas Faustino, Nádia Fernandes, Rafaela Screnci, Douglas Mattos, André de Souza e José Hildefonso.

Aos animais, que mesmo sem consentimento foram indispensavelmente utilizados na execução dos meus projetos acadêmicos.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

CARDOSO, Leonardo Demier, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Outubro de 2017. EFEITO DA IVERMECTINA E DO TRICLORFONE EM BANHO TERAPÊUTICO PARA ACARÁ-BANDEIRA (*Pterophyllum scalare*, LICHTENSTEIN, 1823) PARASITADOS POR *Clinostomum complanatum*. Professor orientador: Manuel Vazquez Vidal Júnior.

A aquicultura brasileira, principalmente no que tange a piscicultura ornamental, conhecidamente fez por muitos anos uso indiscriminado de medicamentos na tentativa de tratamentos para eventuais doenças, seja por falta de informação, seja por falta de medicamentos registrados ou por questões financeiras. É de consenso no meio científico que esse uso empírico e indiscriminado de substâncias químicas trazem uma série de malefícios como seleção de agentes patogênicos, contaminação ambiental e riscos à saúde humana. Em contrapartida, diversas doenças ameaçam o cultivo e a saúde pública pela disseminação de zoonoses. Metacercárias de *Clinostomum complanatum* determinam a zoonose chamada de clinostomíase, além de causarem perdas zootécnicas nos peixes afetados. A mudança que se almeja para que os medicamentos sejam utilizados de forma racional passa por pesquisas que comprovem sua eficácia e seus efeitos tóxicos na produção. Nesse sentido, Buscou-se avaliar a sensibilidade *in vitro* de metacercárias de *Clinostomum complanatum* à ivermectina e triclorfone, assim como a concentração letal média desses compostos em Acará bandeira através de banhos de imersão. Avaliou-se também a eficácia dos medicamentos e incremento de temperatura no tratamento contra metacercárias de *Clinostomum complanatum* encistadas em nadadeiras de acará bandeira. Nos testes *in vitro* foi possível observar que houve sensibilidade do parasita ao triclorfone nas concentrações de 5; 10; 15 e 20 mg / L e à ivermectina nas concentrações de 8 e 10 mg / L. porém, ambos não foram eficazes contra as metacercárias encistadas, assim como o incremento progressivo de temperatura, sendo efetivo apenas a lavagem das nadadeiras em água a 39°C. Dessa forma, foi conclusivo que a ivermectina e o

tricloforne não são eficientes através de banhos de imersão no tempo testado para o tratamento de acará bandeira parasitados por metacercárias de *Clinostomum complanatum*, apesar de haver sensibilidade do parasita às substâncias. Deve-se avaliar a possibilidade de promover a lavagem das nadadeiras com água aquecida visto que apesar de eficaz, gera maior manejo.

Palavras chave: metacercária, metrifonato, zoonose, Peixe ornamental

ABSTRACT

CARDOSO, Leonardo Demier, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. October 2017. EFFECT OF IVERMECTIN AND TRICHLORPHONE IN BATH THERAPEUTICS TO ANGELFISH (*Pterophyllum scalare*, LICHTENSTEIN, 1823) PARASITES BY *Clinostomum complanatum*. Advisor: Manuel Vazquez Vidal Júnior.

Brazilian aquaculture, especially in relation to ornamental fish farming, has for many years been known to have indiscriminate use of medicines in the attempt to treat possible diseases, either due to lack of information, lack of registered medicines or financial reasons. It is a consensus in the scientific world that this empirical and indiscriminate use of chemical substances brings a series of harms such as selection of pathogens, environmental contamination and risks to human health. In contrast, several diseases threaten cultivation and public health by the spread of zoonosis. Metacercariae of *Clinostomum complanatum* determine zoonosis called clinostomiasis, in addition to causing zootechnical losses in the affected fish. The change that is desired for the medicines to be used rationally goes through research that proves its effectiveness and its toxic effects on production. In this sense, we aimed to evaluate the *in vitro* sensitivity of *Clinostomum complanatum* metacercariae to ivermectin and trichlorfene, as well as the average lethal concentration of these compounds in angelfish through immersion baths. It was also evaluated the efficacy of the medicaments and temperature increase in treatment against *Clinostomum complanatum* metacercariae encystified in angelfish fins. In the *in vitro* tests it was possible to observe that there was sensitivity of the parasite to the trichlorfene in the concentrations of 5; 10; 15 and 20 mg / L and to ivermectin at concentrations of 8 and 10 mg / L. However, both were not effective against the metacercariae, as well as the progressive increase of temperature, with only the flushing of the fins in water at 39°C. Thus, it was conclusive that ivermectin and trichlorfene were not efficient through time immersion baths tested for the treatment of angelfish parasitized by *Clinostomum complanatum* metacercariae, despite the sensitivity of the parasite to the

substances. The possibility of promoting the flushing of the fins with heated water should be evaluated, since, although effective, it generates greater handling.

Keys words: metacercaria, metrifonate, zoonosis, Ornamental fish

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Metacercária de <i>Clinostomum complanatum</i>	28
Figura 2 - <i>Pterophyllum scalare</i> parasitado por inúmeros cistos de <i>Clinostomum complanatum</i>	17
Figura 3 - Ascite em <i>Pterophyllum scalare</i> após imersão de 96 horas em triclorfone.....	18
Figura 4 - Membranas císticas vazias de <i>Clinostomum complanatum</i> após a saída das metacercárias	519
Figura 5 - Fotomicrografia de lesões em fígado de acará bandeira (<i>Pterophyllum scalare</i>) submetidos a banhos de imersão em ivermectina e triclorfone.....	533

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Sobrevivência das metacercárias ao decorrer do tempo em soluções de ivermectina	42
Gráfico 2 - Sobrevivência das metacercárias ao decorrer do tempo em soluções de triclorfone.....	42
Gráfico 3 - Curva de mortalidade cumulativa do acará bandeira em decorrência da dose de ivermectina em banho de imersão de 30 minutos	45
Gráfico 4 - Curva de mortalidade cumulativa do acará bandeira em decorrência da dose de triclorfone em banho de imersão de 96 horas	46
Gráfico 5 - Curva de mortalidade cumulativa do acará bandeira em decorrência da dose de triclorfone em banho de imersão de 10 minutos.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais protozoários encontrados parasitando peixes ornamentais.....	22
Tabela 2. Principais moluscos e crustáceos parasitas de peixes de água doce	23
Tabela 3. Principais gêneros de cestoides relatados em peixes de água doce	24
Tabela 4. Principais gêneros de nematoides relatados em peixes de água doce	25
Tabela 5. Número de metacercárias mortas ao decorrer do tempo em banhos com ivermectina e triclorfone	418
Tabela 6. Mortalidade em banhos de imersão de 30 minutos em ivermectina.....	43
Tabela 7. Mortalidade do acará bandeira em banhos de imersão de 96 horas em triclorfone.....	45
Tabela 8. Peso médio inicial e peso médio final em grama dos animais submetidos a diferentes concentrações de triclorfone durante 96 horas	47
Tabela 9. Média dos níveis de oxigênio dissolvido e saturação de oxigênio em diferentes concentrações de triclorfone.....	48
Tabela 10. Mortalidade em banhos de imersão de 10 minutos em triclorfone	49
Tabela 11. Média dos graus de alterações hepáticas em acará bandeira de acordo com a concentração de ivermectina em banhos de 30 minutos	52
Tabela 12. Média dos graus de alterações hepáticas em acará bandeira de acordo com a concentração de triclorfone em banhos de 96 horas	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 JUSTIFICATIVA	18
4 REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1 <i>Pterophyllum scalare</i>	19
4.2 PARASITAS NA PISCICULTURA ORNAMENTAL	20
4.3 CLASSE DIGENEA	25
4.3.1 <i>Clinostomum complanatum</i>	27
4.4 DIAGNÓSTICO	29
4.5 IVERMECTINA.....	30
4.6 TRICLORFONE.....	31
5 MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 <i>TESTE in vitro</i>	33
5.2 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE IVERMECTINA	34
5.3 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE TRICLORFONE	34
5.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	36

5.5 HISTOPATOLÓGICO.....	38
6 RESULTADOS	40
6.1 <i>TESTE in vitro</i>	41
6.2 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE IVERMECTINA	43
6.3 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE TRICLORFONE	45
6.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	50
6.5 HISTOPATOLÓGICO.....	51
7 DISCUSSÃO	55
7.1 <i>TESTE in vitro</i>	56
7.2 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE IVERMECTINA	57
7.3 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE TRICLORFONE	58
7.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	60
7.5 HISTOPATOLÓGICO.....	64
8 CONCLUSÃO	67
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura tem se destacado no mundo todo, apresentando um crescimento de 6,5% ao ano (LEUNG E BEATES, 2012), sendo que no Brasil, esse incremento foi de 15,3% somente em 2010 (MPA, 2012). Influenciado principalmente pela piscicultura, no Brasil esse acelerado crescimento tem relação com fatores como a pequena variação de temperatura da água e do ar, extensas áreas de lâmina de água disponíveis, desenvolvimento de tecnologias e possibilidade de importação de insumos e equipamentos, assim como a extração de espécies na natureza (CAMARGO E POUHEY, 2005).

O mesmo incremento também é observado na piscicultura de espécies ornamentais, uma vez que a inserção de novos produtores é incentivada pelo rápido crescimento dos animais e o alto valor econômico no mercado nacional e internacional, possibilitando uma redução na pressão extrativista sobre as espécies nativas e funcionando como alternativa de renda para a produção familiar (VIDAL JR., 2007; TAVECHIO, 2010). No Brasil, a maior parte dos peixes ornamentais provenientes do extrativismo, são oriundos sobretudo dos rios amazônicos, dos quais destacam-se os ciclídeos, com cerca de 81 espécies, o que corresponde a 6% da ictiofauna total (ARAÚJO et al., 2009). O acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*, LICHTENSTEIN, 1823) é uma delas, e chama atenção pelas suas características anatômicas e comportamentais, que permitem que seja uma das espécies mais difundidas no mercado de peixes ornamentais.

Com o aumento das atividades ligadas a produção de pescado e aquicultura ornamental, elevou-se a relevância de estudos relacionados com parasitos de organismos aquáticos. A composição da comunidade parasitária em peixes depende não só da qualidade da água (disponibilidade de oxigênio dissolvido, variações na temperatura e pH, nível da água e efeitos da sazonalidade), mas também de fatores relacionados ao hospedeiro (habitat, comportamento alimentar, fisiologia, idade e sexo) e fatores relacionados aos parasitos (disponibilidade de larvas infectantes, de hospedeiros individuais, da resposta imune do hospedeiro ao estabelecimento da larva e da mortalidade natural dos parasitos) (TAKEMOTO et al., 2004; CARVALHO et al., 2010; VITAL et al., 2011).

O aumento no cultivo de espécies ornamentais pode propiciar um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro-ambiente, devido às condições que favorecem a transmissão de doenças infecciosas, principalmente os macroparasitos com ciclo de vida direto que causam surtos parasitários e severos danos à produção (BUCHMANN et al., 1987; PONPORNPIKIT et al., 2000; KIM et al., 2002; GARCIA et al., 2009).

Uma das maiores causas de prejuízos na aquicultura comercial é a infestação por parasitas, pois promovem estresse nos peixes de cultivo intensivo que têm seu desempenho zootécnico comprometido e ficam suscetíveis às infecções secundárias responsáveis por danos irreversíveis ao produtor (BATISTA, 2016). Por isso é importante que o produtor atente para a prevenção e o controle, pois são maneiras mais eficazes de manter as doenças fora do sistema.

A ocorrência de helmintos parasitos em peixes é observada frequentemente na natureza e no cultivo. No ambiente natural, apesar da variedade de parasitos ser maior do que a encontrada nos cultivos, os hospedeiros convivem com os parasitos sem que estes lhes causem danos, devido ao equilíbrio estabelecido no cultivo entre o aspecto nutricional e fisiológico do peixe e o meio ambiente, inibindo a manifestação de doenças (MORAES E MARTINS, 2004; GONÇALVES, 2008).

Devido aos prejuízos que os parasitos causam na produção, os produtores são motivados a buscar conhecimento sobre as doenças que atingem os peixes e obter soluções para esse problema (DIAS et al., 2009). Porém, pouca tecnologia é desenvolvida com fins terapêuticos e de diagnóstico das principais doenças e parasitoses, culminando no tratamento empírico feito por grande parte dos piscicultores. O fato dos produtores tentarem realizar tratamentos sem base científica adequada, além de muitas vezes não solucionar os problemas, pode causar degradação do meio ambiente, resistências e intoxicações. No geral, existem comprovações científicas a respeito do mecanismo de ação e eficácia de quimioterápicos, porém, sabe-se que ao ultrapassar determinadas concentrações dos medicamentos, pode-se causar um estresse acentuado nos peixes (FUJIMOTO et al., 2006), aumentando a probabilidade de ocorrência de afecções secundárias.

Muitos vermífugos de uso comum em mamíferos são utilizados na tentativa de se eliminar os parasitas de peixes, porém, nem sempre atingem resultados satisfatórios. Um deles, a ivermectina, é amplamente utilizada em ruminantes e equinos, existindo também recomendações para outros animais domésticos, e até

mesmo para o ser humano, todos com grande eficácia para endo e ectoparasitas. Apesar do excelente resultado nas demais espécies, em peixes seu uso ainda é controverso devido à possível alta toxicidade que a droga confere aos peixes, contudo alguns estudos já comprovaram boa eficácia deste medicamento no combate aos parasitas de peixes.

Diversos outros praguicidas são utilizados indiscriminadamente nos empreendimentos aquícolas, sobretudo organofosforados como o triclorfone, comprometendo a qualidade ambiental dos corpos aquáticos que recebem os efluentes das pisciculturas, além de gerar riscos à saúde dos consumidores e trabalhadores durante o manejo dessas substâncias (LUZIVOTTO-SANTOS, et al., 2009; MÉNDEZ, et al., 2014).

Diante deste quadro, o estudo de doenças parasitárias, assim como a avaliação da eficácia e segurança no uso de drogas anti-parasitárias em peixes, são de suma importância para suprir a falta de informações terapêuticas existente na produção de pescado e espécies ornamentais. Este assunto é de grande relevância para a otimização da produção, pois somente a partir do conhecimento das lesões, diagnóstico e tratamento dos animais, poderão ser formuladas estratégias que contribuam para melhorias da sanidade no cultivo de organismos aquáticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da ivermectina e triclorfone no combate a metacercarias de *Clinostomum complanatum* em exemplares de *Pterophyllum scalare* através de banhos terapêuticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a dose de toxicidade de ivermectina em banhos terapêuticos de trinta minutos para acará bandeira;

Avaliar a dose de toxicidade de triclorfone em banhos terapêuticos de dez minutos para acará bandeira;

Avaliar a concentração letal média de ivermectina em banhos terapêuticos de trinta minutos para acará bandeira;

Avaliar a concentração letal média de triclorfone em banhos terapêuticos de dez minutos e banhos terapêuticos de 96 horas para acará bandeira;

Avaliar se há hepatotoxicidade gerada pelo uso de ivermectina e triclorfone via banho de imersão em acará bandeira

Avaliar a eficácia da ivermectina, triclorfone e incremento de temperatura no combate a cercarias de *Clinostomum complanatum* encistadas em exemplares de *Pterophyllum scalare*.

3 JUSTIFICATIVA

O acará-bandeira é uma espécie amplamente produzida e ocupa grande parte do mercado de peixes ornamentais no Brasil. Muitos produtores do setor sofrem prejuízos com doenças e constantes infecções parasitárias nos seus plantéis.

Apesar das constantes perdas do setor, pouco se tem conhecimento sobre medidas terapêuticas a respeito dos parasitas, sendo amplamente realizado de forma empírica pelos produtores, aumentando, inclusive, as chances de se selecionar indivíduos patogênicos resistentes a determinados medicamentos, portanto, estudos sobre protocolos de tratamento em peixes ornamentais certamente contribuirão com informações importantes para os produtores rurais, assim como para a saúde pública do Brasil, com informações relevantes para o controle de zoonoses como a clinostomíase.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 *Pterophyllum scalare*

O acará-bandeira é um ciclídeo da ordem dos perciformes e classe dos actinopterygii. Anatomicamente, possui o corpo comprimido lateralmente, suas nadadeiras dorsal e anal são alongadas, conferindo um aspecto triangular ao peixe, a nadadeira ventral é fina e longa, no padrão selvagem a cor prateada predomina, contrastando com linhas verticais pretas (AXEROLD, 1993).

A espécie é originária da Bacia Amazônica e habita preferencialmente águas rasas e calmas, entre raízes e folhas de vegetação aquática (FERRAZ, 1999). Na natureza, se alimenta basicamente de invertebrados e é considerado carnívoro (DEGANI, 1993).

O nome da espécie faz referência às suas características anatômicas, onde "*Pterophyllum*", que vem do grego, significa folha alada, justamente devido à forma lanceolada e espessura de seu corpo, e "*scalare*" que significa escada ou degraus devido às listras verticais negras que a espécie apresenta. É um dos mais populares peixes ornamentais de águas tropicais, sendo extremamente difundido entre os aquaristas (CHAPMAN et al., 1997).

O formato do corpo do acará bandeira o possibilita a se movimentar por entre raízes, enquanto sua coloração serve como camuflagem quando descansa entre as plantas (BALDISSEROTTO e GOMES, 2005). Apesar de não exceder os 15 cm em cativeiro, na natureza pode chegar aos 20 cm de comprimento total, podendo viver até sete anos de idade (SANTOS, 1981).

Apesar de se tratar de uma espécie endêmica da bacia amazônica, o cultivo do acará bandeira se iniciou em países da Europa, onde houve também o desenvolvimento de novas variedades e melhoramento genético para fins ornamentais. Posteriormente à Europa, o cultivo estendeu-se para o sudoeste asiático e sul dos Estados Unidos (VIDAL Júnior, 2005).

Com um ano de idade o acará bandeira encontra-se pronto para reprodução. Apesar de haver características de dimorfismo sexual, estas não são muito

evidentes. O macho possui uma maior protuberância na região cefálica, e a fêmea possui a papila genital com diâmetro duas vezes maior que o macho. Por esse orifício os óvulos são expelidos. O casal de acará-bandeira faz sua postura de ovos aderentes em raízes ou folhas submersas de plantas aquáticas (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005).

Durante a reprodução, a fêmea limpa, com a boca, o substrato onde vai desovar e é auxiliada pelo macho. Em 10 minutos a fêmea libera, em um substrato como folhas e troncos submersos, entre 20 e 500 óvulos, que são imediatamente fecundados pelo macho. Após a eclosão, assim como os ovos ficavam, as larvas mantêm-se aderidas ao substrato durante alguns dias. Após duas ou três semanas, os filhotes estarão com uma maior independência, e o casal encontra-se apto a reproduzir novamente (DIAS e CHELLAPPA, 2003).

O tamanho mínimo de comercialização desta espécie é de 2,5 cm de comprimento padrão, porém o mais comum é a comercialização de peixes com 4 a 6 cm, o que depende de um período de engorda de aproximadamente 3 a 4 meses. O preço varia de acordo com o tamanho do corpo e nadadeiras dos exemplares (VIDAL Júnior, 2005).

Diversas linhagens e variedades são encontradas no comércio, sendo, boa parte delas, desenvolvidas em países da Europa, Ásia e nos Estados Unidos (RIBEIRO e FERNANDES, 2008).

4.2 PARASITAS NA PISCICULTURA ORNAMENTAL

A cada dia, a produção de peixes ornamentais torna-se mais intensa, e concomitantemente a esse crescimento, há também o aumento da ocorrência e prejuízos causados por doenças parasitárias e infecciosas (ALVES et al., 2000; KIM et al., 2002). Segundo Dias et. al. (2004), as doenças se tornaram um grande problema na piscicultura brasileira.

O parasitismo em peixes, assim como diversas outras doenças, pode ocorrer ou se intensificar mediante alguns fatores predisponentes, como mudanças ambientais, má qualidade de água, alta decomposição de matéria orgânica e condição nutricional inadequada (FERRAZ, 1999; PIAZZA et al., 2006). Outros

fatores também influenciam, como o transporte inadequado (MARTINS et al., 2007; GARCIA et al., 2003; LIM et al., 2003; ALVES, 2001) e a elevada densidade de estocagem (PIAZZA et al., 2006). Além do qual, o meio aquático facilita substancialmente o deslocamento, acesso e a penetração de agentes patogênicos (SOUSA e ROCHA, 2005).

Além da ocorrência das parasitoses, algo que muito preocupa é a disseminação das mesmas, o que é facilitado pelo transporte de peixes ornamentais (TAVARES-DIAS et al., 2000; MOUTON et al., 2001) principalmente pelo fato de na maioria das vezes, não ser realizado um protocolo adequado de profilaxia e quarentena (EVANS e LESTER, 2001; PIAZZA et al., 2006). Wu Shangong et al., (2007) relataram que parte da disseminação de parasitas se deve ao extensivo comércio de peixes ornamentais e a introdução de poecilídeos para o controle de larvas de mosquito.

A grande disseminação de doenças e parasitos determina não só perdas na produção, mas também problemas de saúde pública, visto que doenças de caráter zoonótico podem estar sendo carregadas. Silva (2011) ao analisar peixes do mercado municipal de Araguaína – TO verificou que quase 100% dos peixes possuíam metacercárias potencialmente patogênicas para o ser humano.

Tavares dias (2010) estudou a fauna parasitária de oito espécies de peixes ornamentais do médio Rio Negro, e de um total de 223 peixes examinados, 64,1% estavam parasitados por pelo menos uma espécie de parasito, reforçando a importância de protocolos de quarentena, visto que os peixes capturados nessa região são comercializados em todo o país.

A gravidade das lesões ocasionadas pelo parasitismo variam de acordo com o local afetado e o grau de infestação, podendo levar inclusive a alterações comportamentais e perda em parâmetros zootécnicos. Segundo Mc Minn (1990) os machos de Guppies parasitados tem o comportamento sexual alterado, o que faz com que as fêmeas não os selecionem para reproduzir. Essas alterações comportamentais foram corroboradas por Menezes (2006), que observou uma redução de libido dos machos de Guppies infectados.

Inúmeros trabalhos científicos e livros publicados fornecem conteúdo informativo sobre a principal fauna parasitária de peixes ornamentais. Podendo-se destacar os protozoários, monogênios, digênios, Crustáceos, moluscos, cestoides,

nematoides, acantocéfalos, hirudíneos e pentastomídeos. (IWASHITA e MACIEL, 2013), (Kubitza e Kubitza, 2004; PAVANELLI et. al., 2008).

Uma grande diversidade de protozoários (Tabela 1) pode ser encontrada parasitando peixes jovens e adultos, e algumas infestações podem significativamente causar grandes perdas econômicas em cultivos aquícolas (KUBITZA e KUBITZA, 2004). E os peixes jovens são normalmente mais susceptíveis ao perderem a imunidade materna transferida até que sejam expostos ao antígeno, produzindo então, anticorpos específicos (BARCELLOS, 2013).

Tabela 1. Principais protozoários encontrados parasitando peixes ornamentais.

Agente patológico	Referência
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (Íctio)	Barcellos, (2013); Noga, (2010); Clemente et al. (2000)
<i>Ichthyobodo necator</i> (Cóstia)	Cano et al. (2016); Pavanelli et al., (2008)
Trichodina	Valladão et al. (2015); Tavares-Dias et al. (2009); Onaka (2009)
Chilodonella	Tavares-Dias et al. (2009); Pavanelli et al., (2008)
Hexamita	Gallani et al. (2016); Reaavill e Roberts, (2007)
Oodinaceae	Tavares-Dias et al. (2009); koyuncu e Cengizler (2002); Onaka (2009).
Epistylis	Kubitza e Kubitza (2004); Pavanelli et al. (2008); Onaka (2009)
Apiosoma	Kubitza e Kubitza (2004); Pavanelli et al. (2008); Onaka (2009)
Ambiphrya	Kubitza e Kubitza (2004); Pavanelli et al. (2008); Onaka (2009)
Myxosporídeos	Fetherman et al. (2014); Granath (2014); Onaka (2009)

Fonte: Autor

Dentre os moluscos e crustáceos (Tabela 2). O primeiro pode ter em suas formas larvais (gloquídias), a atuação temporária como parasitas obrigatórios de

peixes para darem continuidade a sua metamorfose. Já os crustáceos, basicamente 3 grupos (Copépodes, branquiurus e isópodes) abrigam mais de 3000 espécies já descritas parasitando peixes de água doce. Além de estarem relacionados a grandes prejuízos ao cultivo de peixes pela ação direta dos parasitos, os crustáceos são apontados como os principais hospedeiros intermediários e vetores de doenças que acometem os peixes (IWASHITA e MACIEL, 2014).

Tabela 2. Principais moluscos e crustáceos parasitas de peixes de água doce

Grupo	Espécie	Referência
Moluscos	Gloquídeos	Vilizzi et al. (2015); Pavanelli et al., (2008)
Copépodes	<i>Ergasilus sp</i>	Marques, et al. (2015)
	<i>Lernaea sp</i>	Bernardino, et al. (2016); Mirzaei et al. (2014).
Branquiúrus	<i>Argulus sp</i>	Basu et al. (2016); Saurabh et al (2010); Reaavill e Roberts, (2007); Bernardino, et al. (2016)
Isópodes		Kumar et al. (2015); Vijayakumar et al. (2014)

Fonte: Autor

Os representantes da classe Monogenea são os principais parasitas encontrados nas brânquias de peixes, podendo ser encontrados também na superfície corpórea e fossas nasais do hospedeiro. Causam lesões no epitélio branquial e ruptura dos capilares sanguíneos, dificultando o funcionamento das lâminas branquiais e conseqüentemente a respiração. Podem provocar uma proliferação celular resultando em diminuição ou perda da atividade respiratória que, nos casos mais graves, causam a morte do hospedeiro por asfixia (UEDA *et al.*, 2013; PAVANELLI *et al.*, 2008; THATCHER, 2006).

As espécies de monogenéticos de ocorrência mais comum em água doce no Brasil pertencem a família Dactilogiridae (DIAS-GRIGÓRIO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2010; BATISTA, 2016; GRAÇA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2013) e Gyrodactilidae (SILVA *et al.*, 2011; SINGHAL *et al.*, 1986).

Os cestoides (Tabela 3), popularmente conhecidos como tênias, possuem características anatômicas únicas, que os diferenciam de outros parasitos. Seu corpo achatado, em formato de fita com tamanho variado, pode medir até vários metros, possui aspecto segmentado por ser constituído de inúmeras proglótides onde se localizam órgãos sexuais masculinos e femininos (hermafrodita). Na região anterior se localiza a estrutura denominada excólex, que possuem ganchos ou ventosas responsáveis pela fixação do parasita. Quando adultos serão encontrados nos intestinos dos peixes. Por não possuírem boca e sistema digestório, necessitam de absorver os nutrientes já digeridos que transitam pelo intestino, competindo por nutrientes com o hospedeiro (IWASHITA e MACIEL, 2014; KUBITZA e KUBITZA, 2004; PAVANELLI et al. 2008).

Tabela 3. Principais gêneros de cestoides relatados em peixes de água doce.

Gênero	Referências
<i>Corallobothrium</i>	Galaviz-Silva, et al. (2013); Choudhury et al (2004); Kubitza e Kubitza (2004).
<i>Proteocephalus</i>	Onaka (2009); Silva et al. (2011)
<i>Diphyllobothrium</i>	Gustinelli et al. (2016); Iwashita e Maciel (2014)

Fonte: Autor

Já os nematódeos (Tabela 4) possuem o corpo alongado com forma tubular e extremidades afiladas. Geralmente possuem uma coloração marrom amarelado ou marrom avermelhado. São simétricos, com sexos separados. O aparato bucal e tubo digestório são bem desenvolvidos (IWASHITA e MACIEL, 2014; KUBITZA e KUBITZA, 2004). São encontrados na água e no solo, como forma de vida livre, ou como invasores de plantas e animais. Os nematoides adultos, em peixes, vivem no trato gastro intestinal ou cavidades corpóreas (ONAKA, 2009). Os peixes podem desempenhar o papel de hospedeiros intermediários ou paratênicos, através do qual, o ser humano pode se contaminar ao ingerir sua carne crua, confirmando o caráter zoonótico dessa patologia (IWASHITA e MACIEL, 2014).

Tabela 4. Principais gêneros de nematoides relatados em peixes de água doce.

Gênero	Referência
<i>Eustrongylides</i>	Ventura, et al. (2016); Sadrinejad, et al. (2014)
<i>Philonema</i>	Kubitza e Kubitza, (2004)
<i>Philometra</i>	Kubitza e Kubitza, (2004)
<i>Anisakis</i>	Ventura, et al. (2016); Iwashita e Maciel (2014); Fujimoto et al. (2013)
<i>Anguillicola crassus</i>	Pavanelli et al. (2008)
<i>Contracaecum</i>	Ventura, et al. (2016); Iwashita e Maciel (2014)
<i>Pseudoterranova</i>	Iwashita e Maciel (2014)
<i>Camallanidae</i>	Fujimoto et al. (2013); Tavares –Dias et al (2010); Piazza et al. (2006)

Fonte: Autor

4.3 CLASSE DIGENEA

São considerados endoparasitas hermafroditas do grupo dos platelmintos e possuem o corpo caracteristicamente em formato foliáceo e achatado dorso ventralmente. Duas ventosas na região ventral são usadas para a fixação no hospedeiro (IWASHITA e MACIEL, 2014; PAVANELLI et al. 2008). Somente na China, parasitando peixes marinhos, já foram descritos cerca de 630 espécies de digenéticos (LIU et al., 2010), o que demonstra a grande quantidade de trematódeos com potencial parasitário piscícola no ambiente aquático.

A presença de digenéticos por si só, pode não afetar consideravelmente o cultivo, a não ser em infecções massivas ou concomitantes com outros parasitos, porém pode ser considerado um problema de saúde pública devido ao potencial zoonótico de algumas espécies (IWASHITA e MACIEL, 2014). Kubitza e Kubitza

(2004) apontam o *Posthodiplostomum minimum*, conhecido como verme branco, como sendo um dos principais representantes dessa classe de parasitas, porém, muitas espécies de digenéticos podem ser encontrados parasitando peixes de água doce.

Mehrdana, et al. (2014) receberam amostras de platis (*Xiphophorus maculatus*) provenientes de importação de Singapura para Dinamarca. Os peixes estavam letárgicos, e com natação errática. A histopatologia identificou ainda a hipertrofia e hiperplasia do epitélio branquial e fusão lamelar. Evidenciou-se, nesse caso, uma prevalência de 100% de parasitismo por metacercarias de *Centrocestus* sp. nas brânquias. Os autores alertam também sobre o risco da introdução do parasita nas águas do país, visto que se trata de uma zoonose.

Santos e colaboradores (2013) avaliaram 104 exemplares de *Mugil liza* (tainha) coletados na lagoa Rodrigo de Freitas-RJ e encontraram metacercarias (Heterophyidae) em 100% dos animais, localizadas em baço, coração, parede intestinal, fígado, músculo, parede do estômago, gônadas e vesícula biliar. Apenas 13 animais não possuíam metacercarias no músculo, que é a principal região consumida na alimentação humana. Através de ensaio laboratorial, tecidos dos peixes infectados foram fornecidos na alimentação de hamsters e foi possível coletar 4 dias depois uma grande quantidade de parasitas adultos nos intestinos dos hamsters, comprovando a capacidade e periculosidade dos trematódeos infectarem mamíferos através do consumo da carne crua de peixes infectados com metacercárias.

As metacercarias de alguns trematodos digenéticos tem a característica de se alojar nos olhos dos peixes, causando perdas parciais ou totais de visão, o que dificulta a apreensão de alimentos e torna o animal uma presa mais fácil (KUBITZA e KUBITZA, 2004). Yamada et al. (2008) confirmaram a ocorrência de diplostomiase nos olhos de diferentes espécies de peixes coletados no alto rio Paraná, encontrando metacercarias de *Austrodiplostomum compactum* no humor aquoso de mais de 30% dos peixes coletados.

4.3.1 *Clinostomum complanatum*

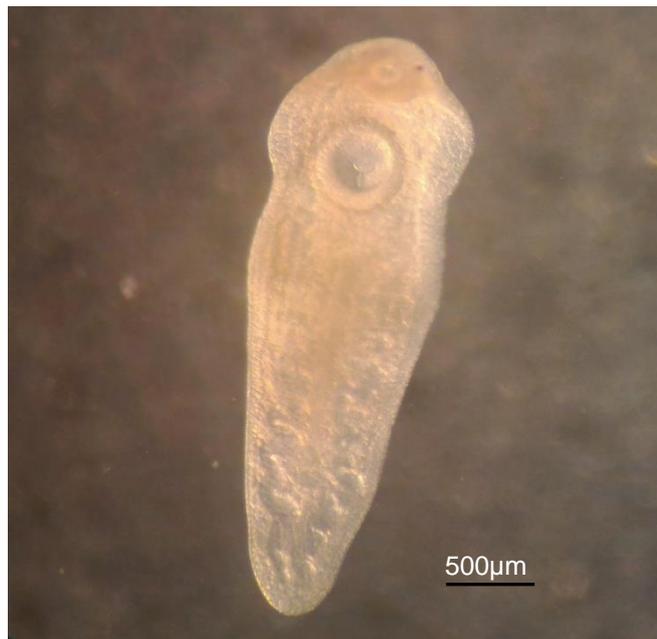
Com ampla distribuição geográfica, os componentes do gênero *Clinostomum* são considerados parasitas definitivos de aves piscívoras, se localizando principalmente na região do trato digestivo superior, como faringe, laringe e esôfago (ROSSER et al., 2017; AOHAGI et al., 1992).

O ciclo de vida do *Clinostomum complanatum* é considerado complexo, envolvendo peixes, moluscos e aves como hospedeiros. As aves parasitadas por indivíduos adultos eliminam em suas fezes os ovos embrionados, que dessa forma atingem a água. Esses ovos ao eclodirem, liberam uma larva ciliada chamada de miracídeo, responsável por invadir e determinar o primeiro hospedeiro intermediário, que são moluscos. Os miracídeos passam então a se desenvolver até que sejam formadas as cercárias, que deixam o molusco e buscam seu segundo hospedeiro intermediário, um peixe. Ao se fixarem no peixe, as cercárias elaboram uma membrana protetora em torno de si, passando a ser denominada, nessa fase de encistamento, como metacercárias. Nessa fase, as metacercárias possuem as características de um indivíduo adulto, exceto pela maturidade sexual, que irá ocorrer no hospedeiro definitivo após o peixe ser capturado por uma ave piscívora. Nela, o parasita se instala no trato digestivo e se reproduz originando ovos embrionados. (PAVANELLI et al., 2015.; KOHN et al., 2013.; EIRAS et al., 2010; KUBITZA e KUBITZA, 2004).

O homem aparece como hospedeiro acidental após o consumo do peixe infectado indevidamente processado. As metacercárias aderem à região orofaríngea, causando faringite e laringite, responsáveis pela dor no ato de deglutição (LEE et al., 2017) Segundo Pavanelli et al., 2015, a clinostomíase em humanos não possui tratamento medicamentoso, sendo necessário a extração instrumental do parasita. Apesar de não haver relatos da doença em humanos no Brasil, os elementos do ciclo evolutivo do parasita estão presentes, e já foi encontrado em diversos peixes de água doce. Os autores não descartam que a falta de familiarização, por parte dos profissionais da saúde, com esse tipo de patologia tenha mascarado diagnósticos e relatos no Brasil.

Metacercárias de *Clinostomum complanatum* (Figura 1) já foram descritas no Brasil parasitando *Astyanax parahybae* (lambari), *Astyanax bimaculatus* (lambari),

Auchenipterus osteomystax (mandi), *Cichlasoma paranaense* (acará), *Gymnotus carapo* (sarapoa), *Hoplias malabaricus* (traíra), *Hoplosternum littorale* (cambot), *Loricariichthys platymetopon* (cascudo), *Leporinus lacustris* (pia), *Oligosarcus hepsetus* (bocarra), *Potamotrygon falkneri* (arraia pintada), *Rhamdia quelen* (jundiá), *Parauchenipterus galeatus* (Cumbaca) (EIRAS et al., 2010), *Salminus brasiliensis* (Dourado) e *Oreochromis niloticus* (Tilápia) (SILVA et al., 2008)



Fonte: Autor

Figura 1 - Metacercária de *Clinostomum complanatum*

Os peixes que apresentam infecções massivas na pele, músculo, nadadeiras ou vceras podem ter os parâmetros zootécnicos afetados, como a diminuição nas taxas de crescimento, perda de fecundidade, alterações comportamentais e em hábitos alimentares, e em alguns casos, morte do hospedeiro, gerando perdas econmicas quando se refere à animais de cultivo (SUTILI et al., 2014; SHAREEF e ABIDI, 2012; SILVA et al., 2008).

4.4 DIAGNÓSTICO

De acordo com Pavanelli *et al.*(2008), a intensa produção de muco nas brânquias e superfície do hospedeiro são o sinal clínico mais facilmente detectado. Os peixes parasitados apresentam sinais como letargia, natação próximo a superfície, nadadeiras fechadas, busca por cantos isolados e redução do apetite. A mudança no comportamento dos peixes caracterizado por se esfregarem junto as laterais de tanques ou aquários, sinaliza a tentativa de se livrar dos parasitos. Devido a esse comportamento, ferimentos podem ser observados no corpo e os mesmos podem contribuir para a instalação de infecções secundárias por bactérias e fungos.

Iwashita e Maciel (2014) defendem que para se realizar o diagnóstico das enfermidades dos peixes de forma mais precisa, as análises laboratoriais são ferramentas de grande importância. Para realização de exames auxiliares ao diagnóstico, os peixes infectados podem ser eutanasiados ou não. Normalmente avalia-se o interesse comercial do peixe e o objetivo da análise (Pavanelli *et al.* 2008). Existem algumas maneiras de se determinar a presença do parasito:

Faz-se a contenção do peixe com o auxílio de um pano úmido e realiza-se a raspagem e coleta do muco para observação em microscópio óptico. Utilizando uma lâmina de microscopia faz-se também a raspagem das brânquias para observação do material coletado. Nesse caso, os peixes podem ser devolvidos aos tanques de cultivo. O muco coletado pode ser observado fresco ou conservado em formol em uma concentração de 5%. Como a maioria dos parasitos possuem movimentos característicos, o exame a fresco do material coletado tende a facilitar a observação (ISHIKAWA *et al.*, 2016).

Quando o peixe apresenta altas infestações e o objetivo é quantificar os parasitos, principalmente nas brânquias, é necessário a eutanásia do animal e a retirada do órgão, que deve ser colocado em formalina comercial numa concentração de 1:4.000 ou água a 60°C, por duas horas. Após esse período, agita-se o frasco para que os parasitos se soltem das lamelas branquiais possibilitando o exame do material em placa de Petri sob lupa ou microscópio (JERÔNIMO *et al.*, 2012; PAVANELLI *et al.*, 2008).

A propagação parasitária pode ser muito rápida e após instalada, a erradicação no ambiente é difícil de acontecer. Ao adquirir novos exemplares, recomenda-se a realização de banhos profiláticos e quarentena. Também se deve evitar submeter estes animais a situações de estresse, visto que isso pode favorecer a instalação dos parasitos (TAVARES-DIAS et al., 2009).

4.5 IVERMECTINA

A ivermectina é uma lactona pertencente ao grupo das avermectinas (DELAYTE et al., 2006). A substância é utilizada com frequência no combate a endoparasitas e ectoparasitas de diversos animais, como ruminantes, equinos, suínos, caprinos e carnívoros.

Alguns estudos comprovam também, sua eficácia nos seres humanos. No Brasil, doenças ectoparasitárias como escabiose, tungíase e larva migrans são muito comuns em áreas de comunidades carentes (HEUKELBACH et al., 2003).

Segundo Heukelbach et al. (2003), o tratamento em massa da escabiose em comunidades carentes demonstrou-se eficiente, porém não é utilizada com muita frequência, ao contrário do que ocorre em países Africanos por exemplo. De acordo com o mesmo autor, o tratamento com ivermectina apresenta baixo custo e alta praticidade, favorecendo à maior aderência ao tratamento por parte das pessoas da comunidade.

A ivermectina age nos canais de cloro controlados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), ocasionando um aumento no fluxo desses íons nas sinapses nervosas em vermes redondos e na placa ou no botão neuromuscular em artrópodes. Consequentemente há hiperpolarização das membranas nervosas, ocasionando paralisia flácida, morte e eliminação dos parasitas (IVOMECS[®], 2014; SAQIB et al., 2015).

O fabricante do BOVECTIN[®] relata que a ivermectina não atravessa a barreira hematoencefálica de mamíferos, logo, não atinge o sistema nervoso central, onde atua o GABA. Assim como afirma Rodríguez-Vivas et al., 2014, que afirma que nos artrópodes, o GABA se encontra nas sinapses neuromusculares, estando susceptíveis aos efeitos da ivermectina, diferentemente dos mamíferos,

onde o GABA atua exclusivamente na região cerebral, estando protegido pela barreira hematoencefálica. Porém, em peixes pode ocorrer de forma diferente, visto que Hoy et. al. (1990) encontrou elevadas concentrações de ivermectina no SNC de *Salmo salar* tratados com a droga, o que indica que a barreira hematoencefálica dessa espécie é pouco desenvolvida.

No tratamento de *Ergasilus labracis* em Salmão do Atlântico, a ivermectina demonstrou boa eficácia, porém, em doses de 0,4 mg/kg de peso vivo por via oral, pode causar mais de 24% de mortalidade (HALLORAN O. J et al., 1992).

4.6 TRICLORFONE

O triclorfone pertence ao grupo químico dos organofosforados e tem uso difundido como pesticida nas mais diferentes áreas agropecuárias. Esta relacionado a graves problemas por afetar ecossistemas aquáticos não alvo, ao ser utilizado de forma indiscriminada em sistemas agrícolas e de produção pecuária (MÉNDEZ, et al., 2014).

Sua ação contra o parasita se dá por promover a fosforilação da enzima acetilcolinesterase, responsável por modular os níveis de acetilcolina nas sinapses nervosas. Essa fosforilação é uma reação considerada quase irreversível, inibindo a acetilcolinesterase e tendo como resultado o acúmulo de acetilcolina nas fendas sinápticas neuromusculares, que dessa forma se mantêm despolarizadas e colinergicamente hiperestimuladas, o que por sua vez ocasiona paralisia espástica e morte dos parasitas (BARROS et al. 2006; ZACHARY, 2007). Portanto, a sintomatologia encontrada nos casos de intoxicação pelo triclorfon resultam da hiperestimulação do sistema parassimpático (ZACHARY, 2007).

Segundo VENTURINI, 2010, em meio aquático, principalmente em pH alcalino, o triclorfon pode representar grande risco a organismos não alvo, como peixes e crustáceos, visto que a substância é rapidamente hidrolisada à diclorvos, sendo a segunda, mais tóxica que a primeira.

No Brasil, encontra-se produtos comerciais a base de triclorfon com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, prevendo e liberando seu uso na aquicultura. Segundo as recomendações do produto Masoten[®], o Triclorfon é

efetivo através de banhos terapêuticos em peixes de água doce contra uma série de parasitoses, como *Argulus* sp., *Ergasilus* sp., *Lernea* sp., *Trichodinas*, *Dactylogyrus* sp., *Gyrodactylus* sp. e diversos trematódeos (MASOTEN[®], 2017). Porém, as bulas ainda indicam dosagens a um número restrito de espécies de peixes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no setor de Aquicultura do Laboratório de Zootecnia do CCTA/UENF, Campos dos Goytacazes – RJ. Os peixes analisados foram provenientes do polo produtor de peixes ornamentais de Muriaé - MG.

5.1 TESTE *in vitro*

Para a realização dos testes “*in vitro*”, avaliando a sensibilidade de cercarias de *Clinostomum complanatum* à ivermectina e triclorfone (metrifonato), acarás bandeiras parasitados foram abatidos por concussão cerebral e suas nadadeiras imediatamente retiradas e postas em água previamente aquecida à 39°C para a saída espontânea e obtenção das metacercarias.

Em seguida, as metacercarias foram distribuídas casualizadamente em seus respectivos tratamentos, compostos por progressivas concentrações de ivermectina (4, 6, 8 e 10 mg/L) e triclorfone (5, 10, 15, 20 mg/L) diluídos em solução fisiológica 0,9% estéril, além do tratamento controle, sem adição de medicamentos. Cada metacercaria representava uma repetição, totalizando 25 repetições. Os tratamentos foram mantidos em banho maria à 39°C, sendo, as metacercarias, observadas com auxílio de microscópio óptico e estereomicroscópio com o intervalo de 15 minutos. A partir da quarta observação, não havendo mortes ou mudanças significativas, o intervalo entre observações passou a ser feito a cada trinta minutos. Após mais quatro observações o intervalo passou a ser de uma hora até que não houvesse mais metacercarias vivas, a fim de se identificar o comportamento e o tempo de sobrevivência das metacercarias em cada tratamento.

5.2 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE IVERMECTINA

Para avaliação da toxicidade e concentração letal média de ivermectina em acarás bandeira através de banhos terapêuticos, foram utilizados 40 indivíduos adultos e clinicamente saudáveis de acará bandeira, os quais foram pesados e medidos quanto a altura e comprimento padrão, divididos em grupos com mesmo peso para então serem distribuídos entre os tratamentos.

Compunham os tratamentos banhos terapêuticos onde os animais ficavam imersos em água com a devida concentração de ivermectina (0, 20, 35, 50, 65 mg/L) pelo período de 30 minutos e posteriormente soltos em aquários com a água de origem. Cada animal foi considerado uma repetição, totalizando cinco tratamentos com 8 repetições. Durante o experimento manteve-se aeração leve e constante. O nível de água durante o banho de imersão foi definido em 50 ml para cada um grama de peso vivo, mantendo-se a concentração determinada de cada tratamento.

Durante os 30 minutos de imersão, os peixes foram observados para detecção de sinais indicadores de intoxicação como natação errática, alteração de movimentos respiratórios, desequilíbrio e morte. Após esse período, os animais foram então transferidos para aquários onde efetuou-se troca parcial de água de 30% diariamente e a observação estendeu-se por 96 horas, quando foram abatidos por secção medular para realização de necropsia e coleta do fígado. O órgão foi preservado em formol neutro 10% para realização de exame histopatológico. O mesmo procedimento foi executado com os peixes que morreram ao decorrer das 96 horas. Para determinar a concentração letal média foi considerada a dose de ivermectina onde 50% dos peixes morreram desde o momento do banho de imersão até as 96 horas posteriores.

5.3 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) TRICLORFONE

Para avaliação da toxicidade e concentração letal média de triclorfone em acarás bandeira através de banhos terapêuticos, foram utilizados 96 indivíduos

adultos e clinicamente saudáveis de acará bandeira, os quais foram pesados e medidos quanto a altura e comprimento padrão, divididos em grupos com mesmo peso para então serem distribuídos entre os tratamentos.

O experimento foi dividido em duas fases, onde na primeira, 56 animais, após biometria inicial foram dispostos em oito repetições entre os sete tratamentos de concentrações progressivas de triclorfone (0, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5 mg/L). Os animais permaneceram em aquários individuais, com a proporção de um Litro de água por grama de peso vivo, e cada qual com a concentração de triclorfone determinada pelo tratamento. Os peixes foram mantidos sob os tratamentos pelo período de 96 horas, enquanto eram observados os sinais indicadores de intoxicação.

Diariamente, após aferir temperatura, nível de oxigênio dissolvido e pH, a água era totalmente sifonada e substituída, mantendo-se a mesma concentração de triclorfone, que era pesado diariamente em balança analítica de 5 casas decimais e diluído na água a qual substituía a anterior. Os peixes mortos durante o experimento passaram por biometria e necropsia, onde se avaliou macroscopicamente os órgãos internos e se coletou o fígado para histopatologia. O mesmo procedimento biométrico e necroscópico foi realizado em todos os peixes abatidos por secção medular após as 96 horas de exposição ao triclorfone.

A segunda fase foi composta por cinco tratamentos com 8 repetições, onde um tratamento era o controle, em que não se adicionou o triclorfone, e os demais continham doses crescentes do agente químico (10, 15, 20, 25 mg/L). Nessa fase, porém, procurou-se utilizar o protocolo indicado para o tratamento de ectoparasitas em carpas pelo medicamento Masoten[®], através de banho de imersão pelo período de 10 minutos.

O nível de água durante o banho de imersão manteve a proporção de 50 ml para cada um grama de peso vivo, sendo respeitada a concentração determinada de cada tratamento e a aeração foi constantemente mantida por um sistema de compressor e pedras porosas difusoras, individualmente postas nas unidades experimentais.

Após os dez minutos de imersão nas soluções supracitadas, os peixes foram alocados em aquários individuais com água livre de medicamentos, onde foram mantidos por 96 horas. Durante todo o experimento, os peixes ficaram sob observação, e os animais mortos foram necropsiados e tiveram o fígado coletado e

fixado em formol neutro 10%, assim como ocorreu com os demais peixes ao fim do experimento após serem abatidos por secção medular.

Em ambas as fases considerou-se como concentração letal média a dose em que 50% dos animais morreram ao decorrer dos experimentos.

5.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Os testes para se obter protocolo de tratamento contra cercarias de *Clinostomum complanatum* encistadas em nadadeiras de acaras bandeira envolveram três fases, totalizando treze tratamentos com oito repetições cada. Todos os peixes utilizados estavam confirmadamente parasitados através de visualização direta dos cistos na superfície corpórea.

No primeiro momento, testou-se banhos de imersão com quatro diferentes doses de triclorfone (10,15, 20, 25 mg/L) pelo período de dez minutos, quatro doses de ivermectina (4, 6, 8, 10 mg/L) em banhos terapêuticos de 30 minutos, e um tratamento controle, onde os peixes passaram por banho de imersão de 30 minutos, porém em água sem adição de agentes químicos. Para o triclorfone, foi utilizado o medicamento comercial neguvon[®] com 97% de princípio ativo. O produto foi pesado em balança analítica de cinco casas decimais para que se atingisse a dose específica de cada tratamento. Em relação à ivermectina, foi utilizado o medicamento comercial Ivomec[®] Solução oral, com 0,08% de concentração de ivermectina. Nesse caso, o princípio ativo foi dosado com o auxílio de seringas hipodérmicas de um mililitro.

Todos os peixes, após decorrido o tempo do banho de imersão, foram translocados para aquários independentes com dois Litros de capacidade volumétrica útil, onde permaneceram pelo período de 7 dias. Durante todo o experimento, os animais ficaram sob observação quanto suas características físicas e comportamentais que indicassem intoxicação ou demonstrassem a morte ou saída das cercarias. Diariamente os aquários eram sifonados, observando-se a presença de cercarias soltas ao fundo e 30% da água era trocada. Ao término, os peixes foram abatidos por secção medular, necropsiados e o fígado fixado individualmente em formol neutro a 10% até ser encaminhado à histopatologia.

A segunda fase visou induzir a saída das cercarias por elevação gradativa da temperatura ambiente. Assim sendo, oito repetições foram mantidas em aquários individuais de 1,5 Litros de capacidade volumétrica útil em temperatura estável à 22°C, enquanto outros oito animais igualmente individualizados em aquários compunham o segundo tratamento, em que os aquários foram submetidos à banho Maria em uma caixa termo protegida a fim de se evitar variações de temperatura influenciadas pela temperatura atmosférica. Como fonte de calor utilizou-se um ebulidor elétrico de 1800 Watts e uma bomba submersa promovendo a circulação de água, mantendo a homogeneidade da temperatura por todas as repetições. Para evitar que os níveis de oxigênio dissolvido tivessem um decréscimo circunstancial, resultante do aquecimento da água, os aquários foram munidos de pedras porosas difusoras alimentadas por um compressor de ar, mantendo aeração constante da água.

A temperatura foi então elevada constantemente obedecendo a taxa de 1°C a cada 30 minutos até atingir os 39°C, tolerados pela espécie (IKEDA et al., 2011). Após atingir essa marca o aquecedor foi desligado e a temperatura abaixou gradativamente até estabilizar naturalmente. Durante os testes houve constante observação a fim de se detectar a saída das cercarias. Para facilitar essa observação, os aquários utilizados possuíam fundo preto para garantir o contraste com as metacercarias.

Por fim, a terceira fase dessa etapa também envolveu o incremento de temperatura para induzir a evasão das cercarias encistadas na superfície das nadadeiras dos peixes. Para tal, selecionou-se 16 peixes notoriamente parasitados, dividindo-os em 8 repetições para o tratamento controle e 8 repetições para o tratamento de lavagem com água aquecida.

Para a execução, uma caixa termo isolada foi abastecida com água proveniente de onde estavam estocados os peixes. A água foi aquecida com um ebulidor elétrico até a temperatura de 39°C. Com o auxílio de uma bomba submersa a água era ejetada através de uma mangueira de silicone de quatro milímetros de calibre interno a uma vazão de 44 L/h. Os peixes foram pegos individualmente e as nadadeiras uma a uma eram abertas manualmente e expostas ao jato de água sem fricção mecânica dos cistos e sem banhar todo o corpo do animal. Um fundo preto de vidro foi utilizado a fim de facilitar a visualização das cercarias ao abandonarem os cistos.

Como tratamento controle, as nadadeiras dos peixes foram submetidas ao mesmo procedimento, sendo expostas ao jato de água na vazão 44 L/h, porém, a temperatura da água utilizada foi a mesma da água onde os peixes estavam estocados.

Todos os peixes foram mantidos em aquários individuais após o procedimento por quatro dias para observação de mortalidade pós tratamento.

5.5 HISTOPATOLÓGICO

Durante a necropsia dos animais utilizados nos experimentos anteriores, os órgãos e cavidades naturais foram macroscopicamente avaliados quanto à forma, textura, consistência, coloração das superfícies e acúmulo de líquidos. Os fígados foram coletados inteiros e imediatamente fixados e identificados individualmente em formalina neutra tamponada a 10%. Todo material foi fixado por um período mínimo de 48 horas.

Todo material coletado para avaliação histopatológica foi processado no Laboratório de morfologia do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, e no Laboratório de patologia animal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, ambos da Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre.

Após serem fixadas, as amostras passaram pelo processo de clivagem e foram acondicionadas em histossetes plásticos, subsequencialmente iniciou-se o processamento manual, onde as amostras foram desidratadas em cinco banhos sequenciais de álcool etílico, sendo o primeiro banho em álcool a 70%, o segundo em álcool a 80%, o terceiro em álcool a 90% e os dois seguintes em álcool absoluto, com duração de 30 minutos cada. Seguido da clarificação das amostras por imersão em dois banhos de xilol, de 10 minutos cada e impregnação por imersão das amostras em dois banhos, de 30 minutos cada, em parafina histológica a 60°C. Em sequencia, o material foi incluído em blocos de parafina.

Após a solidificação, os blocos foram resfriados e cortados em seções de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo. Os cortes provenientes foram imediatamente colocados em banheira histológica a 60°C, de onde foram coletados

por lâminas de vidro e corados manualmente, pelo método hematoxilina e eosina (HE).

Após a montagem das lâminas, as mesmas foram analisadas individualmente em microscópio óptico por dois observadores de onde também foram tomadas imagens fotográficas. As alterações de congestão, degeneração gordurosa e degeneração hidrópica foram classificadas em uma escala de 0 a 3 de acordo com o grau de severidade e acometimento hepático, onde 0 indica normalidade, 1 indica alteração leve, 2 indica alteração moderada e 3 indica alteração de grau severo.

6 RESULTADOS

Os peixes oriundos de produtores do polo de piscicultura ornamental da região de Muriaé após serem recebidos, em primeira análise apresentavam formações amareladas e áreas hemorrágicas nas nadadeiras Figura 2. Aparentemente sem comprometimento locomotor. Não foram encontrados cistos na cavidade oral, nos opérculos, narinas e tampouco em órgãos internos. A miríade de pontos amarelos foi evidenciada como cistos individuais contendo um trematoide em seu interior, identificado como metacercárias de *Clinostomum complanatum* no Laboratório de parasitologia veterinária do Hospital veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo. Apesar de cada cisto conter uma metacercaria, por vezes eles se sobrepunham, impossibilitando a contagem do número de cistos em cada hospedeiro. Foi possível quantificar de 1 a 287 metacercarias por hospedeiro.



Figura 2 - *Pterophyllum scalare* parasitado por inúmeros cistos de *Clinostomum complanatum*

Os dados de sobrevivência do teste *in vitro* foram submetidos aos testes Log-rank, realizado no programa GRAPHPAD PRISM 6.0. Os gráficos 1 e 2 mostram as curvas de sobrevivência das metacercárias ao decorrer do tempo em soluções de ivermectina e triclorfone respectivamente, demonstrando que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre as doses 8 e 10 mg/L de ivermectina e os demais tratamentos, inclusive o controle. Em relação ao triclorfone, as metacercárias foram significativamente sensíveis à todas as doses testadas ($p < 0,0001$), com um período de sobrevivência menor que no tratamento controle, porém, não diferindo entre elas.

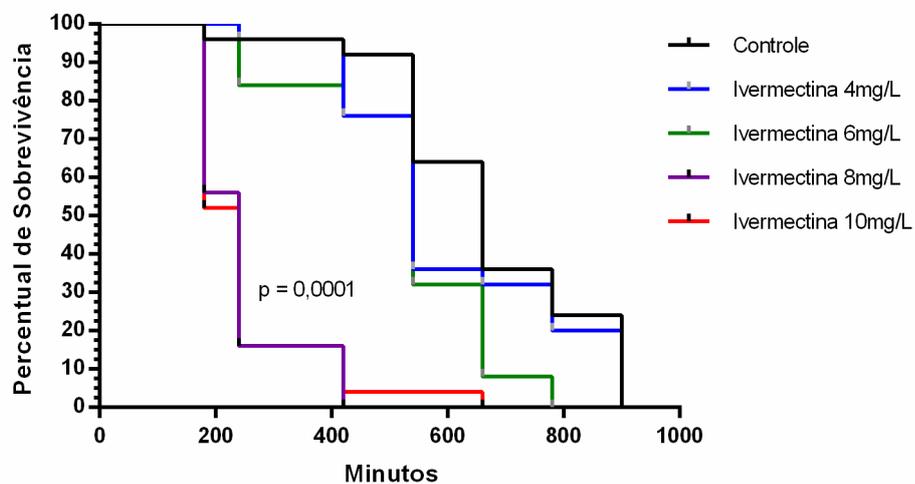


Gráfico 1: Sobrevivência das metacercárias ao decorrer do tempo em soluções de ivermectina.

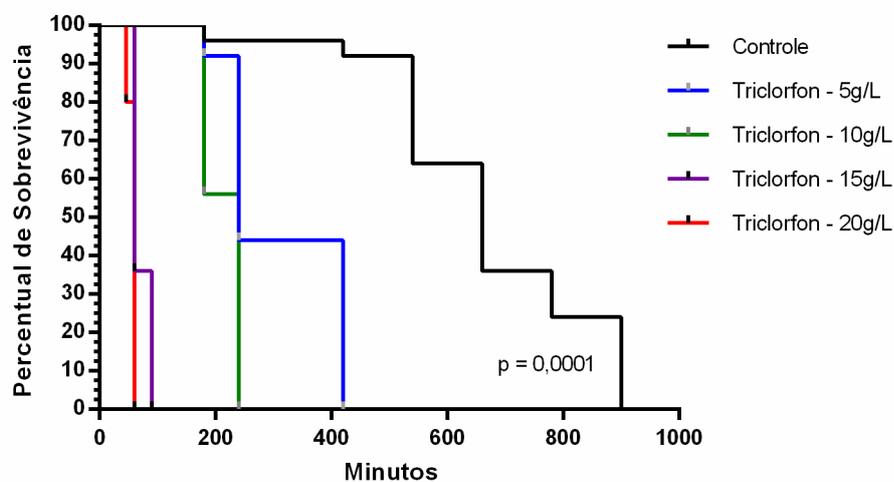


Gráfico 2: Sobrevivência das metacercárias ao decorrer do tempo em soluções de Triclorfone.

6.2. CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE IVERMECTINA

O teste de concentração letal média de ivermectina em banho com 30 minutos de imersão para acará bandeira apresentou as mortalidades expressas na tabela 6.

Tabela 6. Mortalidade em banhos de imersão de 30 minutos em ivermectina

Tratamento	Número de mortos
0 mg / L	0
20 mg / L	0
35 mg / L	1
50 mg / L	4
65 mg / L	5

Durante o banho de imersão, os peixes do tratamento controle se mantiveram sem variações comportamentais claras, enquanto os do tratamento 20 mg / L ao 5 minutos de banho apesar de se manterem na vertical, apresentavam algum atordoamento. Os batimentos operculares eram profundos e não parecem afetados. Ao término dos 30 minutos e ao serem liberados em água limpa, os peixes deitaram no fundo do aquário, porém apresentaram rápida recuperação em dois minutos, estando aparentemente recuperados aos 4 minutos pós banho.

Os peixes do tratamento 35 mg / L aos 4 minutos de banho estavam em posição horizontal e sem movimentos de nadadeiras. Aos 15 minutos os batimentos operculares eram superficiais, apesar do ritmo de 120 batimentos por minuto. Dois minutos depois iniciou-se movimentos nas nadadeiras peitorais aparentemente involuntários. As primeiras reações observadas ao término do banho foram o retorno do batimento opercular profundo dois minutos pós banho e um minuto depois os animais nadavam em círculos. Um animal morreu logo após o banho, enquanto os

outros se recuperaram em até 24 horas após o banho, exceto uma repetição, que levou 48 horas para expressar comportamento normal.

Os peixes que compunham o tratamento 50 mg / L estavam imóveis ou deitados aos 3 minutos de banho associado à diminuição dos movimentos operculares. Os espasmos das nadadeiras peitorais tiveram início aos 10 minutos de banho, e aos 15, era possível observar um movimento opercular a cada sete segundos. Ao serem soltos em água limpa após os 30 minutos de tratamento, todos os peixes ficaram na horizontal deitados no fundo do aquário, iniciando as reações quatro minutos depois, quando os peixes começaram a tentar nadar e manter o equilíbrio, situação que perdurou por 24 horas nos animais que sobreviveram, visto que quatro deles estavam mortos 4 horas após o banho. Durante esse período de recuperação, Os peixes variavam momentos de natação em círculos com momentos em que se mantinham deitados no fundo do aquário, e decorridas 48 horas os animais mantinham o equilíbrio, nadando lentamente pelo aquário.

No tratamento de 65 mg / L os peixes estavam imóveis aos 3 minutos de banho e os espasmos nas nadadeiras peitorais iniciaram com 5 minutos de banho. Assim como no tratamento anterior, os movimentos operculares foram afetados, contabilizando-se aos 15 minutos de banho um movimento a cada 9 segundos. 4 horas após o banho cinco animais haviam morrido. No período de recuperação pós banho, os peixes alternavam momentos em que ficavam deitados no fundo e momentos de natação em círculos, até que 48 horas depois se mantinham mais equilibrados nadando lentamente. Ao final das 96 horas de observação, os peixes pareciam clinicamente bem, porém mais lentos que o habitual.

Com base nos índices de mortalidade e análise de regressão de probit realizada no programa Statgraphic Centurion chegou-se a curva de mortalidade representada pelo gráfico 3, apontando a dose de 55,454 mg / L como a concentração letal média de ivermectina para o acará bandeira adulto em banhos de 30 minutos.

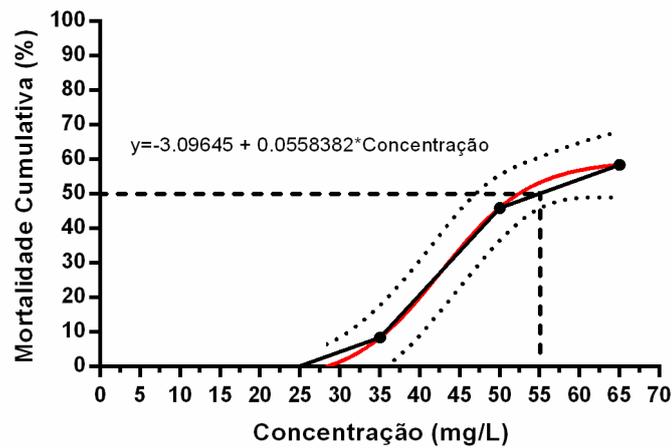


Gráfico 3: Curva de mortalidade cumulativa do acará bandeira em decorrência da dose de ivermectina em banho de imersão de 30 minutos.

6.3. CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) TRICLORFONE

O teste de concentração letal média de triclorfone em banho com 96 horas de imersão para acará bandeira apresentou as mortalidades expressas na tabela 7.

Tabela 7. Mortalidade do acará bandeira em banhos de imersão de 96 horas em triclorfone

Tratamento	Número de mortos
0 mg / L	0
0,3 mg / L	0
0,6 mg / L	1
0,9 mg / L	1
1,2 mg / L	2
1,5 mg / L	5
1,8 mg / L	7

A concentração letal média de triclorfone para o acará bandeira adulto em banhos de 96 horas foi determinada com base nos índices de mortalidade e análise

de regressão de probit realizada no programa Statgraphic Centurion chegando-se na dose de 1,36464 mg / L. A curva de mortalidade representada está representada pelo gráfico 4.

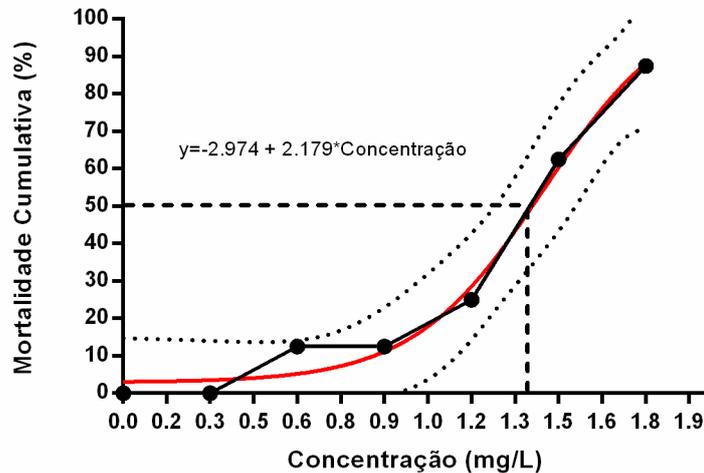


Gráfico 4: Curva de mortalidade cumulativa do acará bandeira em decorrência da dose de Triclorfone em banho de imersão de 96 horas

Durante as 96 horas de observação o tratamento controle e o tratamento 0,3 mg / L não demonstraram alterações comportamentais, enquanto o tratamento 0,6 mg / L apresentou pequenos sinais de hiperexcitação a partir de 48 horas.

No tratamento 0,9 mg / L os peixes estavam hiperexcitados após 48 horas, evoluindo para convulsões quando estimulados a partir de 72 horas. Ao término das 96 horas, era possível observar grande agitação e reatividade dos animais.

No tratamento 1,2 mg / L foram observadas alterações ao passar 42 horas de banho, onde alguns peixes estavam deitados no fundo do aquário. Os sinais de intoxicação progrediram observando-se animais com desequilíbrio, de cabeça para baixo e convulsões. As mortes ocorreram as 66 horas e 72 horas, e os demais, que sobreviveram, estavam gravemente afetados ao término das 96 horas.

No tratamento 1,5 mg / L, a hiperexcitação dos animais foi observada a partir de 48 horas, também progredindo para distúrbios natatórios e convulsões durante as horas seguintes. As mortes ocorreram no período de 49 a 79 horas de banho, e os sobreviventes também estavam gravemente afetados ao término do tratamento.

Os peixes do tratamento 1,8 mg / L já estavam hiperexcitados nas primeiras 24 horas, sendo que em 49 horas os peixes praticamente não nadavam, ficando

deitados no fundo do aquário. A primeira morte ocorreu com 24 horas de banho, sendo as subsequentes com 42 horas, 49 horas, 66 horas, 72 horas e duas mortes com 96 horas. O único indivíduo sobrevivente estava gravemente afetado, sem qualquer tipo de reação.

Os peixes submetidos às doses mais altas de triclorfone possuíam acúmulo de líquido na cavidade celomática, observado na necropsia (Figura 3). A média de peso aferido na biometria inicial e final encontra-se na tabela 8



Figura 3 - Ascite em *Pterophyllum scalare* após imersão de 96 horas em triclorfone

Tabela 8. Peso médio inicial e peso médio final em grama dos animais submetidos a diferentes concentrações de triclorfone durante 96 horas

	0,3 mg/L	0,3 mg/L	0,6 mg/L	0,9 mg/L	1,2 mg/L	1,5 mg/L	1,8 mg L
Peso inicial (g)	8,6375	8,575	8,6625	8,925	8,625	8,6125	8,7875
Peso final (g)	8,125	8,025	8,2	8,3625	8,8	8,95	9,15

Em relação ao peso, utilizou-se o Teste t para amostras pareadas com o auxílio do programa BIOESTAT 5.3, comprovando estatisticamente que os peixes utilizados nos tratamentos controle; 0,3 mg / L; 0,6 mg / L e 0,9 mg / L perderam peso ao longo do experimento, enquanto no tratamento 1,2 mg / L houve um ganho

de peso estatisticamente não significativo e nos tratamentos 1,5 mg / L e 1,8 mg / L os animais aumentaram significativamente o peso até o fim do experimento.

O pH e os níveis de oxigênio dissolvido foram monitorados durante o experimento, aferindo-se sempre no momento anterior à troca de água. Para avaliação estatística dos dados obtidos, utilizou-se a técnica de ANOVA, seguido do teste de Tukey, realizado no programa BIOESTAT 5.3.

Não houve diferença significativa entre os grupos testados em relação ao pH ($p=0,1274$).

A análise estatística mostrou que existe diferença significativa entre os grupos estudados quanto ao oxigênio dissolvido ($p=0,0006$) e saturação de oxigênio ($p=0,0004$) (tabela 9), no entanto, somente os grupo expostos a 1,5 e 1,8 mg/L de triclorfone apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,01$), mas não diferiu significativamente dos demais grupos expostos ao triclorfone. Ainda, é possível verificar que o grupo exposto a 1,8mg/L de triclorfone diferiu do grupo exposto a 0,3mg/L.

Tabela 9. Média dos níveis de oxigênio dissolvido e saturação de oxigênio em diferentes concentrações de triclorfone.

	Controle	0,3 mg/L	0,6 mg/L	0,9 mg/L	1,2 mg/L	1,5 mg/L	1,8 mg/L
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,72a	5,56 ^a	5,44 ^{ab}	5,44 ^{ab}	5,39 ^{ab}	5,06 ^b	4,95 ^b
Saturação de oxigênio(%)	71,91 ^a	71,09 ^a	68,38 ^{ab}	68,51 ^{ab}	67,77 ^{ab}	63,60 ^b	62,64 ^b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ao nível de 1% de significância.

Em banhos de imersão de 10 minutos, as doses de triclorfone causaram mortalidade em acará bandeira (tabela 10) com o auxílio do programa Statgraphic Centurion foi realizada regressão de probit, gerando a curva de mortalidade cumulativa em decorrência da concentração de triclorfone representada pelo gráfico 5. Sendo considerada a concentração letal média para acará bandeira, a dose de 21,8947 mg de triclorfone por litro de água.

Tabela 10. Mortalidade em banhos de imersão de 10 minutos em triclofone

Tratamento	Número de mortos
0 mg / L	0
10 mg / L	0
15 mg / L	0
20 mg / L	2
25 mg / L	7

Dentre os animais submetidos aos banhos de imersão por 10 minutos em doses de triclofone, os representantes do tratamento controle e do tratamento 10 mg / L não apresentaram sinais de alteração durante o período experimental. No tratamento 15 mg / L os peixes pareciam levemente afetados, sem muitos distúrbios natatórios e apresentaram pequenas lesões nas extremidades das nadadeiras.

Os peixes dos tratamentos 20 mg / L e 25 mg / L após os 10 minutos de banho passaram as primeiras 4 horas deitados no fundo do aquário, sendo que as mortes ocorreram no período de 18 a 24 horas após o tratamento. Os demais, que sobreviveram se recuperaram clinicamente, não apresentando sinais evidentes de intoxicação aguda ao término das observações.

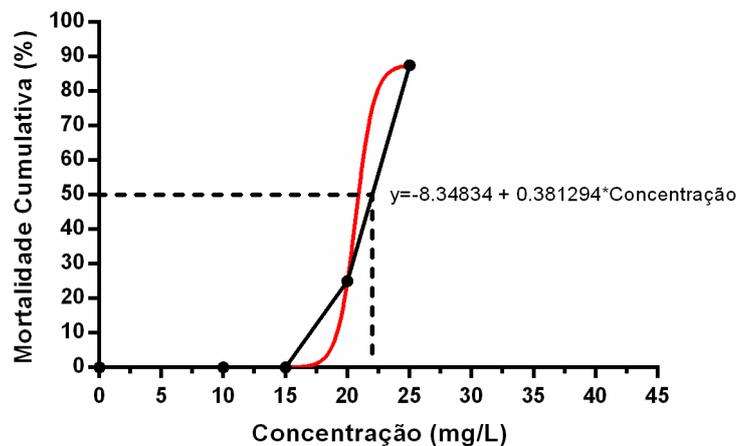


Gráfico 5: Curva de mortalidade cumulativa do acará bandeira em decorrência da dose de triclofone em banho de imersão de 10 minutos.

6.4. PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Os protocolos de tratamento contra metacercárias de *Clinostomum complanatum* encistadas nas nadadeiras de acará bandeira testados tiveram como resultado a ineficácia de todos tratamentos a base de ivermectina (4, 6, 8, 10 mg/L) em banhos de imersão de 30 minutos. As metacercárias não deixaram o hospedeiro e permaneceram vivas durante o período de observação de 7 dias pós tratamento. Apesar de não ter havido mortalidade, os peixes submetidos as doses de 8 e 10 mg / L apresentaram atordoamento durante o tratamento e se recuperaram poucos minutos após deixarem o banho de imersão.

O triclorfone na concentração de 10 mg / L não promoveu a morte tampouco a saída do parasita do hospedeiro durante o período experimental. Nas doses de 15 mg / L e 20 mg / L no período de dois a quatro dias após o tratamento houve a saída parcial das metacercárias e morte de dois indivíduos do tratamento 20 mg / L, enquanto na dose de 25 mg / L houve a mortalidade de 7 indivíduos, que morreram com as metacercárias ainda encistadas em suas nadadeiras.

O aumento gradual e constante da temperatura teve início com a água a 22°C e prosseguiu o constante incremento de 1°C a cada 30 minutos até que se atingiu 39°C, momento em que os peixes apresentaram mudanças comportamentais como atordoamento, natação errática e tentativas de saltos na superfície. Em duas repetições houve a saída de duas metacercárias, portanto o tratamento não foi capaz de promover o desencistamento das metacercárias.

Para o tratamento de lavagem das nadadeiras em água aquecida a 39°C, os peixes estavam inicialmente em aquários com temperatura de 26°C. Um a um, foram submetidos ao tratamento e em todas as repetições, 100% das metacercárias deixaram o hospedeiro e foram depositadas vivas em uma caixa de coleta. A mortalidade foi de um peixe no período de 24 horas após o tratamento. Após a saída das metacercárias, permaneceram as membranas protetoras que delimitavam os cistos, porém encontravam-se rompidas e vazias (figura 4).



Figura 4 - Membranas císticas vazias de *Clinostomum complanatum* após a saída das metacercárias.

6.5. HISTOPATOLÓGICO

A análise histopatológica das amostras hepáticas coletadas revelou uma série de alterações de caráter degenerativo e congestivo nos fígados (Figura 5). Além da congestão vascular evidenciada pela dilatação e repleção de vasos sanguíneos em graus de severidade que variaram de leve a severa, as degenerações hidrópicas e gordurosas também foram evidentes, subdivididas nos mesmos moldes de graus de severidade, onde se observou respectivamente o acúmulo de líquido intracelular sem deslocamento nuclear e o acúmulo de gordura intracelular, sendo visível ao microscópio os vacúolos esféricos e deslocamento do núcleo em direção as bordas das células.

Os resultados histopatológicos foram significativos no que tange os animais utilizados no teste de concentração letal média de ivermectina (tabela 11). Nesse teste utilizou-se a técnica de ANOVA seguido do teste de Tukey, realizado no programa BIOESTAT 5.3

Tabela 11. Média dos graus de alterações hepáticas em acará bandeira de acordo com a concentração de ivermectina em banhos de 30 minutos.

Tratamento	Congestão	Degeneração gordurosa	Degeneração hidrópica
0 mg / L	0 _a	0 _a	0,375 _a
20 mg / L	1,625 _b	1,625 _b	1,125 _{ab}
35 mg / L	1,375 _b	1,75 _b	1 _{ab}
50 mg / L	2,25 _b	1,875 _b	2 _{ab}
65 mg / L	1,75 _b	2,2375 _b	2,285 _b

Grau 0: Normal; Grau 1: alteração leve; Grau 2: Alteração moderada; Grau 3: Alteração severa
Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ao nível de 1% de significância.

A análise estatística mostrou que existe diferença significativa entre os grupos estudados quanto a congestão hepática ($p=0,0007$), sendo que todos os grupos expostos a ivermectina não diferenciaram entre si, apresentando congestão, enquanto no grupo controle ela não ocorreu.

Existe também diferença significativa entre os grupos estudados quanto a degeneração gordurosa hepática ($p=0,0012$), sendo que todos os grupos expostos a ivermectina apresentaram degeneração gordurosa diferenciando-se apenas do grupo controle, onde não houve essa degeneração. Quanto a degeneração hidrópica hepática ($p=0,0189$), no entanto, somente o grupo exposto a 65mg/L apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($p<0,05$), mas não diferiu significativamente dos demais grupos expostos à ivermectina.

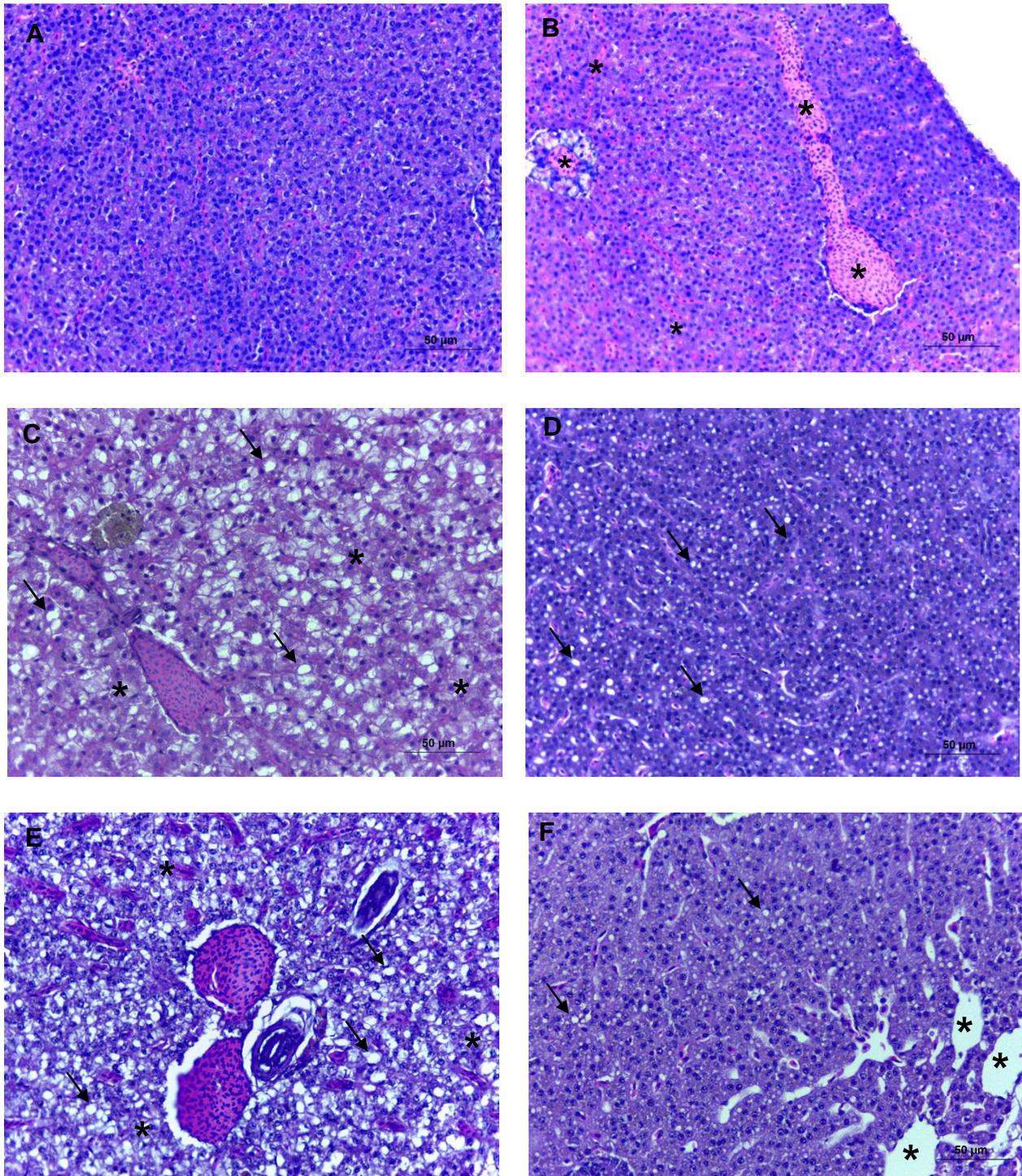


Figura 5 – Fotomicrografia de lesões em fígado de acará bandeira (*Pterophyllum scalare*) submetidos a banhos de imersão em ivermectina e triclorfone. Campos dos Goytacazes - RJ, 2017.

Legenda: A – Fígado normal, amostra 37. B – Congestão severa (*), amostra 103. C - Congestão severa em vaso, degeneração hidrópica severa (*), degeneração gordurosa severa (seta), amostra 123. D – Degeneração gordurosa moderada (*), amostra 94. E – Congestão severa em vaso sanguíneo, degeneração gordurosa severa (seta) e degeneração hidrópica moderada (*), amostra 1. F – Vasos normais (*), degeneração gordurosa leve (seta). A, B, C, D, E e F coloração de hematoxilina-eosina (HE).

Em relação ao triclorfone (tabela 12), O teste estatístico mostrou que não existe diferença significativa entre os grupos estudados quanto a congestão hepática ($p=0,0574$), Degeneração gordurosa hepática ($p=0,0992$) e quanto a Degeneração hidrópica ($p=0,566$).

Tabela 12. Média dos graus de alterações hepáticas em acará bandeira de acordo com a concentração de triclorfone em banhos de 96 horas.

Tratamento	Congestão	Degeneração gordurosa	Degeneração hidrópica
0 mg / L	2	1,75	2,25
0,3 mg / L	1,375	1,625	1,5
0,6 mg / L	1,125	1,25	1,25
0,9 mg / L	0,625	2	2,25
1,2 mg / L	0,625	1,875	1,625
1,5 mg / L	1,714	2,428	2,285
1,8 mg / L	0,571	3	2

Grau 0: Normal; Grau 1: alteração leve; Grau 2: Alteração moderada; Grau 3: Alteração severa

7 DISCUSSÃO

Diversas espécies de peixes brasileiros já foram descritos como hospedeiros de metacercarias de *Clinostomum complanatum* (EIRAS et al., 2010), porém, no acará bandeira não há relatos, a não ser por outras espécies de mesmo gênero, como o *Clinostomum marginatum* encontrado por Alves, et al. 2001 em acará bandeira proveniente de cultivo, onde os animais possuíam sintomatologia semelhante à encontrada no presente trabalho.

Apesar do número variável de metacercarias por hospedeiro, a quantidade de cistos não parece ser determinada por alguma característica fenotípica do peixe, não tendo relação com o tamanho corporal do animal (DALY, et al., 1987), Ressaltando-se que a maior parte dos cistos se encontravam na maior nadadeira do peixe estudado, a dorsal, apesar de terem sido encontrados parasitas em todas as nadadeiras.

O arranjo de cistos nas nadadeiras, formando pontos isolados ou grumos amarelos é também descrito por diversos autores (WANG, et al., 2017; SILVA et al., 2008), porém, no presente estudo houve a evidência do parasitismo apenas nas superfícies das nadadeiras, diferentemente de autores como Silva et al. (2008) que descreveram em tilápia (*Oreochromis niloticus*), jundiá (*Rhamdia quelen*) e Dourado (*Salminus brasiliensis*) a presença do parasita na cavidade bucal, brânquias, olho, miocárdio, intestino, fígado, estômago e musculatura.

O acometimento de diversos órgãos caracteriza maior gravidade da doença em comparação ao parasitismo focalizado nas nadadeiras, todavia, os pontos hemorrágicos formados podem atuar como portas de entrada para agentes patogênicos secundários, como bactérias e fungos (PAVANELLI, et al., 2008). As respostas inflamatórias são evidentes e concomitantemente o decréscimo dos índices zootécnicos podem ocorrer. Lima et al. (2014) comprovaram que jundiás (*Rhamdia quelen*) naturalmente infectados por metacercarias de *C. complanatum* possuíam altas taxas de citocinas pró inflamatórias na corrente sanguínea. As perdas econômicas são decretadas também pelo aspecto repugnante impedindo a comercialização.

7.1 TESTE *in vitro*

O teste *in vitro* revelou interessantes resultados, onde demonstrou que existe sensibilidade das metacercárias em relação a ivermectina e ao triclorfone, porém, a relação dose/tempo de exposição poderia ser letal aos peixes. A dose mais alta de triclorfone (20mg /L) levou cerca de 45 a 60 minutos para causar a morte das metacercárias enquanto a mesma dose nos peixes já causou mortalidade em 10 minutos de exposição. A dose mais baixa testada, de 5 mg / L levou até 420 minutos para provocar a morte de todas metacercárias.

Estatisticamente em relação ao tratamento controle, as metacercárias sobreviveram menos tempo nas concentrações de ivermectina de 8 e 10 mg /L, o que indica que existe sensibilidade, porém, o tempo necessário para que as metacercárias morressem foi de 180 a 420 minutos, e ao se confrontar os dados obtidos no mesmo trabalho, o acará bandeira demonstrou sinais de intoxicação aguda nessas mesmas doses em apenas 30 minutos de imersão.

O experimento *in vitro* demonstrou que as metacercárias desencistadas podem sobreviver em solução fisiológica 0,9% por até 15 horas a 39°C. Resultados distintos dos encontrados por Wang, et al. (2017). Os autores identificaram que as metacercárias sobreviveram por até 60 horas em solução fisiológica 0,8% a 22°C. Segundo os autores, as metacercárias não apresentavam mais movimentos após 12 horas de experimento e houve uma pequena mortalidade nas primeiras 24 horas, sendo o período de maior mortalidade entre 36 e 48 horas, onde mais de 64% das metacercárias morreram. Apesar da discrepância nos resultados entende-se que o principal fundamento para tal encontra-se na diferença de temperatura, que age no metabolismo fisiológico de metacercárias trematodas (ROJAS, et al., 2015). Dessa forma, submetidos à uma temperatura mais alta, o metabolismo das metacercárias seria acelerado e necessitaria de fontes energéticas mais rapidamente. Não havendo, o parasita morre, corroborando com a teoria de Wang, et al. (2017) de que as metacercárias de *Clinostomum complanatum* dependem de seus hospedeiros para sobreviver.

7.2 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) DE IVERMECTINA

Informações sobre a farmacocinética e toxicologia da ivermectina em peixes ainda é escassa, apesar de ser bem difundida em outros ramos agropecuários. Além dos riscos ambientais, que seriam igualmente comparáveis nas demais atividades, o uso na aquicultura ornamental não representa riscos diretos à saúde humana como nos casos onde se destina a produção ao consumo alimentício. Na União Européia por exemplo, se determinou o período de carência de 49 dias após o uso de ivermectina em mamíferos de produção, sendo que os maiores níveis de ivermectina e seus resíduos são encontrados em gordura, fígado e no músculo onde efetua-se a aplicação (ESCRIBANO et al., 2012).

Segundo Horsberg (2012), a principal indicação da ivermectina na aquicultura seria para o controle de copepodes ectoparasitas. Segundo o autor, apesar de não ser licenciada, a ivermectina era utilizada em cultivos de salmão na Irlanda, Canadá e Chile. Palmer et al., 1987 são autores de um dos primeiros trabalhos publicados a respeito da toxicidade e eficácia da ivermectina contra ectoparasita em peixes, concluindo que apesar de obter bons resultados com a dose oral de 0,2 mg / Kg, a mortalidade subiu de 2% para 24% ao utilizar 0,4mg / L, indicando baixa tolerância ao medicamento por parte dos salmões.

Nos parasitas, de modo geral, a ivermectina atua nas sinapses neuromusculares, onde o GABA está presente (Rodríguez-Vivas et al., 2014), porém a sintomatologia nervosa encontrada nos acarás bandeira que remete a paralisia flácida, com ausência ou diminuição de movimentos natatórios e respiratórios pode confirmar que nos peixes a barreira hematoencefálica não inibe, pelo menos com a mesma eficiência dos mamíferos, que a ivermectina atinja tecidos cerebrais. Hoy et. al. (1990) supuseram que a barreira hematoencefálica de salmões seria menos desenvolvida que a dos mamíferos, pois ao utilizar ivermectina marcada com trítio, pode confirmar altas concentrações da substância em tecidos gordurosos e no sistema nervoso central. Confirmou também que por realizar ciclo entero hepático, a ivermectina se mantém no organismo do salmão por longos períodos, diminuindo 35% da concentração entre o dia 4 e o dia 28 após administração.

Não foram encontradas publicações a respeito dos efeitos tóxicos da ivermectina sobre o *Pterophyllum scalare*, sobretudo doses e concentrações letais do medicamento testadas para essa espécie via oral ou em banhos de imersão. Grande parte dos trabalhos com uso ivermectina em peixes se referem a salmonídeos.

Oliveira et al. (2016) testaram a concentração letal de ivermectina através de imersão de 96 horas em diferentes fases de vida do *Danio rerio*, encontrando os seguintes resultados: juvenil = 17,21 µg/L, adultos = 74,88 µg/L e em embriões = < 800 µg/L. Possivelmente os embriões apresentam mais resistência devido a proteção coriônica ou pela imaturidade dos sítios alvo da ivermectina. Apesar de trabalhar com outra espécie, as características indicativas de intoxicação foram semelhantes às apresentadas pelo acará bandeira desse trabalho como letargia, desequilíbrio, natação errática e alterações dos movimentos operculares.

A maior disparidade encontrada entre as diferentes publicações e o presente trabalho está relacionada ao tempo de exposição, dificultando a comparação dos resultados de concentração letal entre as espécies. O acará bandeira teve CL 50 de 55,454 mg/L em 30 minutos de exposição, enquanto no *Anguilla anguilla* a CL 50 foi de 0,2 µg/L em 24 horas (GEETS et al., 1992), *Lepomis macrochirus* teve CL 50 = 4,8 µg/L em 96 horas (HARLLEY et al., 1989) e *Danio rerio* teve perda de movimentos com 440 µg/L em 24 horas (CARLSSON et al., 2013). Portanto, além das particularidades intraespecíficas, o tempo de exposição influencia diretamente no resultado encontrado de CL50.

7.3 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL50) TRICLORFONE

Não se encontrou registros da utilização do *Pterophyllum scalare* como modelo biológico envolvendo estudos toxicológicos de triclorfone. A CL50 em 96 horas de exposição estimada para o acará bandeira através desse trabalho foi de 1,36464 mg / L, dose essa, elevada se comparada com os 0,04 mg / L para juvenis e 0,07 para jovens de pacu determinadas por Venturini (2010), ou com os 0,18 mg / L para alevinos de *Piaractus brachypomus* (pirapitinga) (MÉNDEZ et al., 2014), porém parece baixa quando comparada a CL50 de 21,7 mg / L para *Oreochromis*

nilótico (AIKAHEM et al., 1998). A sintomatologia de intoxicação demonstra semelhanças, como convulsões, movimentos corporais rápidos e dificuldade respiratória.

As relevantes diferenças entre os dados apresentados e demais autores são compreensíveis ao se ponderar as características fisiológicas de cada espécie, assim como a diferença de idade entre os animais estudados, visto que animais mais jovens tendem a ser mais sensíveis.

O banho em 10 minutos de imersão em triclorfone permitiu que se chegasse a CL50 de 21,8947 mg / L para o acará bandeira. Esse fato realça a importância de testes que demonstrem a sensibilidade das espécies mais cultivadas, visto que de acordo com a bula do medicamento Masoten[®] (2017) existe a indicação de banhos de 5 a 10 minutos em concentração de 20 mg / L para carpas. Nessa concentração já havia mortalidade para o acará bandeira, além de se tratar de uma curta margem de confiança. Tal fato também demonstra os riscos da utilização indiscriminada dos medicamentos, pois as espécies tratadas não necessariamente desenvolverão respostas similares.

O comportamento hiperexcitado em diversos peixes estudados podem ser explicados através do mecanismo de ação do triclorfone. Fosforilando a acetilcolinesterase nas sinapses nervosas, ocorre o acúmulo de acetil colina e consequente hiperestimulação do sistema parassimpático (ZACHARY, 2007). Mataqueiro, et al. (2014) concluíram que o triclorfone inibiu significativamente a atividade da acetilcolinesterase no plasma sanguíneo e no cérebro de *Piaractus mesopotamicus* necessitando de sete dias para retomar a atividade enzimática normal. Experimentos com tilápia, que aparentemente possui maior resistência ao triclorfone, também confirmam os efeitos sobre a acetilcolinesterase. Guimarães et al. (2007) utilizaram a concentração de 25 ppm de triclorfone nas tilápias, e averiguou que houve significativa inibição da acetilcolinesterase após 8 horas de exposição, e em 96 horas a redução na atividade enzimática chegou a 85%.

Os níveis de oxigênio dissolvido na água foram estatisticamente menores nos grupos de triclorfone, principalmente nas doses mais altas. Apesar de não atingir níveis críticos, o fato intensifica a necessidade de utilização de aeração durante o tratamento com esse composto.

Seria natural que os animais perdessem peso ao longo do experimento, pois foram mantidos em jejum, porém a medida que se aumentou a dose de triclorfone no

banho de 96 horas, os peixes perderam menos peso que o tratamento controle e nas 3 maiores concentrações houve ganho de peso, sobretudo nas doses de 1,5 e 1,8 mg / L. O aumento de peso foi resultante da ascite desenvolvida por esses animais. De acordo com Werner (2015), entre as causas de edema, pode-se destacar as alterações na pressão coloidal osmótica decorrentes de hepatopatias e de doenças renais caracterizadas por proteinúria. As lesões hepáticas e renais são características da intoxicação por triclorfone. Veiga et al. (2002) expuseram exemplares de *Prochilodus lineatus* (Curimbata) à doses subletais de triclorfone encontrando graves lesões renais como dilatação glomerular, perda do conteúdo celular do epitélio capsular parietal e da membrana basal, inchaço, vacuolização e granulações no citoplasma das células tubulares e focos de necrose acentuada.

7.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

O estudo realizado testou diversas formas de tratamento, envolvendo banhos de imersão em doses de ivermectina, doses de triclorfone e incremento de temperatura, objetivando matar e, ou expulsar as metacercarias de *Clinostomum complanatum* encistadas nas nadadeiras de exemplares de *Pterophyllum scalare*. Ao se consultar a literatura, vê-se que o tratamento da clinostomíase é um problema até mesmo em humanos. Nos relatos, comumente os parasitos são retirados mecanicamente com o auxílio de pinças e laringoscópios (LEE et al., 2017; PAVANELLI et al., 2015; NORIHITO, et al., 2003).

Alguns autores defendem que em peixes, o tratamento medicamentoso é ineficaz, restando o controle da fauna de hospedeiros intermediários como caramujos e o controle de aves piscívoras que se infectadas podem perpetuar o ciclo do parasita, por conter ovos embrionados em suas fezes (PAVANELLI et al., 2015).

DA SILVA et al., 2009 descreveram um tratamento eficaz a base de praziquantel, onde os exemplares de *Rhamdia quelen* parasitados foram mantidos à concentração de praziquantel de 1 mg / L, variando o tempo de tratamento. Os tempos de 1 a 15 horas tiveram redução de 75,7% a 96,3% no número de cistos ao fim de 18 dias de observação, enquanto a exposição por 20 horas teve 100% de

eficácia, porém, a morte rápida dos parasitas favoreceu a ocorrência de infecções secundárias.

Lo et al. (1981) descreveram um tratamento acidental à base de triclorfone, porém indicaram como mais eficiente a profilaxia através do controle ambiental, esvaziando os viveiros, tratando com formol 10% e promovendo um vazio sanitário de 1 mês. Dessa forma, afirmam promover o controle de caramujos.

A observação do tratamento acidental se deu devido a uma alta e repentina mortalidade de *Plecoglossus Altivelis* cultivados no lago Chu-pei em Taiwan. Segundo os autores, houve um tratamento com triclorfone na dose de 1 mg / L no dia anterior, e ao analisar os peixes, haviam lesões de perfuração por todo o corpo e presença de *Clinostomum complanatum* se deslocando.

Os autores entenderam que apesar do alvo do tratamento ser outro, o triclorfone atingiu os *C. complanatum*, que na tentativa de deixar o hospedeiro causaram as perfurações, que teriam culminado na morte dos peixes. Porém, ao se considerar que doses de triclorfone de 5 e 10mg /L foram testadas nesse trabalho sem que o parasita deixasse o hospedeiro, e apenas a partir de 15mg / L houve alguma resposta, deve-se considerar que a mortalidade relatada por Lo et al. (1981) possa ter outras causas envolvidas. A principio, pode ter havido coincidentemente à data, um estímulo ambiental que deflagrou a saída do parasita, causando as perfurações e conseqüente morte dos hospedeiros. Outra possibilidade seria o acometimento dos peixes à alguma patologia de caráter infeccioso ou não, que tenham provocado as mortes, e dessa forma os parasitas poderiam deixar o hospedeiro, formando as lesões *pós mortem*, tal qual Rizvi et al. (2012) observaram o êxodo de 1101 metacercárias *C. complanatum* provenientes de 35 *Trichogaster fasciatus* logo após a morte dos peixes por uma variação na qualidade de água.

As doses de triclorfone de 15 e 20 mg / L em um único banho de imersão promoveram a queda de parte das metacercárias encistadas, abrindo questionamentos sobre a possibilidade de atingir melhores resultados em banhos sequenciais. Apesar de factível, deve-se alertar para outras possibilidades, como a seleção de patógenos resistentes caso parte não seja afetada pelo tratamento e maiores possibilidades de intoxicação, sendo pertinentes estudos que comprovem a meia vida do medicamento no organismo do peixe a ser trabalhado, como Mataqueiro, et al. (2014) observaram em pacus, foram necessários 7 dias de recuperação para reestabelecer a atividade normal da acetilcolinesterase após

exposição ao triclorfone. Esse tipo de informação contribui para o estabelecimento de tempo entre doses subsequentes.

Apesar das concentrações de ivermectina de 8 e 10 mg / L terem influenciado significativamente na sobrevivência das metacercarias de *Clinostomum complanatum* no teste *in vitro*, a eficácia do medicamento não se fez presente no tratamento dos animais parasitados. Segundo Wang et al. (2017), o tempo de sobrevivência das metacercarias não difere estando elas encistadas ou não, porém, o limitante em um teste *in vitro* seria a carência nutricional, visto que fora dos hospedeiros, não havia alimentação para as metacercárias. Em teoria, a membrana do cisto parasitário poderia conferir uma certa proteção em relação à passagem de substâncias, mas com base nos dados obtidos, não se pode inferir que isso ocorra, pois no comparativo entre os testes realizados, no hospedeiro, a imersão foi de 30 minutos, enquanto *in vitro*, as doses de ivermectina levaram a pelo menos 180 minutos para que se tivesse alguma mortalidade das metacercarias. O mesmo ocorreu com o triclorfone, onde os testes com os hospedeiros foram baseados em banho de 10 minutos enquanto *in vitro* a primeira morte nos tratamentos de triclorfone ocorreu aos 45 minutos de exposição. Tempo esses inviáveis nas mesmas concentrações para utilização em acará bandeira.

Do ponto de vista da segurança alimentar, qualquer tipo de tratamento em animais de produção envolve riscos. Na piscicultura esses riscos são ainda mais complexos, devido a vasta variedade de espécies, sendo que cada qual possui suas particularidades fisiológicas e metabólicas, podendo alterar por exemplo o período de carência para o consumo da carne após o tratamento. Em pacus, o triclorfone pode levar mais de 50 dias para ser excretado totalmente do organismo (LOPES, et al., 2006), porém, segundo o Masoten[®] (2017), o período de carência em pacus é de 22 dias e para tilápias de 40 dias. Essa diferença pode ser ocasionada pela diferença de temperatura em que os testes foram realizados. A ivermectina segue a mesma linhade raciocínio, visto que a temperatura da água pode afetar a meia vida do composto no organismo. Horsberg (2012) cita diversos trabalhos determinando a meia vida da ivermectina em diferentes espécies. Os números variam de 2,2 a 33 dias.

Do ponto de vista ambiental os riscos também estão presentes, porém, alguns autores defendem que a ivermectina não ameaça gravemente o meio ambiente. Davies et al. (1998) testaram a bioacumulação da ivermectina em

mexilhões e crustáceos na costa da Escócia, próximo a criatórios de Salmão que faziam uso de ivermectina, e concluiu que as concentrações ambientais eram pequenas, sendo os efeitos tóxicos improváveis para organismos não alvo. Segundo Halley et al (1989) a ivermectina pode sofrer degradação em 12 horas na água quando exposta ao sol, além disso, ao se difundir no sedimento, dificilmente torna à forma aquosa. Já Sanderson et al. (2007) constataram que a meia vida da ivermectina em água seria entre 3 a 5 dias.

Os protocolos de tratamento testados através do incremento de temperatura foram criados com base nas características do ciclo de vida do platelminto estudado. Primeiramente, sabe-se que o hospedeiro definitivo dos *Clinistomum* sp. são aves piscívoras, e acidentalmente o homem ou outro mamífero que se alimente de peixes, somando-se ao fato do indivíduo adulto se localizar na região superior do tubo digestivo do hospedeiro (ROSSER et al., 2017), entende-se que o parasita deva deixar o cisto antes de chegar ao estômago, excluindo-se, a princípio, as altas concentrações de enzimas digestivas como principal ativador do desencistamento. Dessa forma, voltou-se o foco para temperatura, e considerando que a temperatura das aves de modo geral se mantém em torno de 41 a 42 °C, podendo ser próximo aos 38°C a depender do ambiente e espécie (WELKER et al., 2008), associado a temperatura máxima suportada pelo acará bandeira, próximo de 39°C (IKEDA et al., 2011; PÉREZ et al., 2003) foram determinados os tratamentos.

O acréscimo gradual da temperatura foi realizado durante 8 horas e 30 minutos, atingindo 39°C, objetivando o estímulo de saída dos parasitas sem provocar o choque térmico e morte dos peixes. Apesar de não provocar a morte dos peixes, o acréscimo da temperatura foi estressante, evidenciado pelo aumento de batimentos operculares e distúrbios natatoriais nas temperaturas mais elevadas. O desencistamento das metacercárias porém, não ocorreu, permitindo inferir que a temperatura final não provoca o estímulo necessário para que o parasita deixe o hospedeiro se não houver uma variação repentina entre a temperatura inicial e final. Ao se remeter ao ciclo de vida do parasita e como o processo ocorre naturalmente, vê-se que o mesmo é exposto repentinamente à temperatura corporal de aves piscívoras no momento da predação (KOHN et al., 2013.; EIRAS et al., 2010), logo, o acréscimo gradual da temperatura promove a aclimação do parasita ao ambiente.

Por outro lado, a lavagem das nadadeiras em água previamente aquecida mimetiza mais fidedignamente o estímulo térmico provocado durante a predação. No momento da lavagem com água a 39°C, as metacercárias romperam os cistos imediatamente, corroborando com os resultados de LO et al. (1987) e Kalantan e Arfin (1987) que testaram a imersão dos cistos em diversas faixas de temperatura, e em ambos os trabalhos, se obteve o desencistamento em temperaturas de 38°C e os autores concluem que em 41°C o processo ocorreu mais vigorosamente.

A alta temperatura também pode ser nociva ao parasita. LO et al. (1988) e Kalantan e Arfin (1987) afirmam que a partir de 45°C as metacercárias se tornavam inativas e morriam, em 50°C no intervalo de 10 minutos no interior do cisto, o que remete ao questionamento se tratamentos químicos agressivos podem também ocasionar a morte súbita do parasito, e o mesmo continuar fixado sobre o hospedeiro.

A única forma efetiva de tratamento testada neste trabalho foi a lavagem individual de nadadeiras com água a 39°C, o que pode gerar alta mão de obra quando se objetiva tratar um lote numeroso de peixes. Como as metacercárias deixam os cistos ainda vivas, é recomendado mantê-las aquecidas a 50°C por no mínimo 10 minutos (KALANTAN e ARFIN, 1988) ou aguardar que morram antes do descarte da água. O manejo estressante também pode ocasionar a morte de parte dos animais, portanto, deve-se avaliar o custo benefício do tratamento antes de determiná-lo. Ressalta-se que o tratamento não exclui a importância de se realizar medidas como desinfecção de tanques de cultivo, controle de caramujos e aves piscívoras, sob o risco de reinfecção dos animais tratados.

7.5 HISTOPATOLÓGICO

Os achados histopatológicos encontrados nos grupos de peixes testados apresentaram significativas alterações, onde evidenciou-se congestão hepática, degeneração gordurosa e degeneração hidrópica principalmente nos animais expostos à ivermectina destacando-se do tratamento controle, em que a estrutura hepática permaneceu preservada.

A degeneração hidrópica é considerada uma lesão aguda na célula funcional do fígado. A patogenia oriunda normalmente de agressões tóxicas, metabólicas e hipóxicas que afetam bombas eletrolíticas responsáveis pelo equilíbrio hidroeletrolítico celular resultando no acúmulo de líquido na célula. (BARROS, 2010; PEREIRA, 2013)

A degeneração gordurosa, ou esteatose hepática se dá pelo acúmulo de gordura no interior dos hepatócitos. A causa pode estar relacionada a hepatotoxinas que afetam as funções mitocondriais e microssomais inibindo a oxidação de gorduras (BARROS, 2010) outro fundamento para a esteatose é a desnutrição proteico energética, que deflagra a mobilização de lipídeos oriundos do tecido adiposo para o fígado (PEREIRA, 2013).

Em mamíferos, a congestão de vasos hepáticos está quase sempre relacionada a insuficiências cardíacas (BARROS, 2010) e Segundo Baldisseroto (2013) em determinadas circunstâncias o organismo dos peixes podem sofrer adaptações metabólicas. Acredita-se que nos peixes expostos à ivermectina, tenha havido maior fluxo sanguíneo no fígado, a fim de metabolizar o mais rápido possível o composto tóxico. E os conceitos fornecidos por Barros (2010) e Pereira (2013), fundamentam a hipótese de que as degenerações hepáticas encontradas nos peixes expostos à ivermectina tenham causas tóxicas.

Varó et al. (2010) detectaram em *Sparus aurata* que receberam ivermectina via oral na dose 0,2 mg / kg, alteração dos níveis de 36 proteínas hepáticas envolvidas no metabolismo. Segundo os autores essas alterações preconizam as lesões detectáveis nas análises histopatológicas.

As lesões hepáticas microscópicas relatadas em peixes que foram expostos ao triclorfone incluem deslocamento nucleolar no hepatócito, células hipertrofiadas e áreas de necrose, como descrito por Mataqueiro et al (2008) em *Piaractus mesopotamicus*, e por Fanta et al. (2003) em *Corydoras paleatus*. Os acarás bandeiras usados nesse trabalho não desenvolveram lesões tão graves ao serem expostos ao triclorfone.

A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os níveis de severidade das alterações hepáticas entre os tratamentos de exposição ao triclorfone na determinação de DL50 e o controle. Assim como não houve diferença entre os tratamentos testados no experimento de protocolo de tratamento. Nesses casos, até mesmo os tratamentos controle possuíam alterações hepáticas.

É importante salientar que isso não significa que altas concentrações de triclorfone não causem alterações a nível hepático. Com fundamentação em Barros (2010) e Pereira (2013) as lesões encontradas podem ser geradas por caráter nutricional. O lote de peixes utilizados no experimento de DL50 de triclorfone foram adquiridos com escore corporal baixo, indicando que os animais pudessem estar desnutridos. E os peixes utilizados no protocolo de tratamento passaram por jejum prévio de 1 dia somado aos 7 dias de observação, totalizando um longo jejum. Acredita-se então, que parte das alterações hepáticas desses indivíduos tenham ocorrido em decorrência da deficiência proteico energética, mascarando os resultados reais, assim como proposto por Mladineo et al. (2006), que creditam as alterações hepáticas à escassez nutricional após os peixes passarem pelo jejum de 6 dias.

8 CONCLUSÃO

Com as informações obtidas é possível concluir que as metacercárias de *Clinostomum complanatum* são sensíveis à ivermectina e ao triclorfone, porém a dose e o tempo de exposição necessários para efetuar o tratamento quando as mesmas encontram-se encistadas nas nadadeiras de acarás bandeira (*Pterophyllum scalare*) são incompatíveis com os níveis de toxicidade suportados pelos peixe, visto que a concentração letal média desses compostos para o acará bandeira não dão margem de segurança para efetuar o tratamento.

Doses letais e subletais de ivermectina causam alterações hepáticas em *Pterophyllum scalare*.

O incremento de temperatura pode ser utilizado eficientemente no controle das metacercarias encistadas nas nadadeiras dos peixes na forma de lavagem das nadadeiras com água previamente aquecida a 39°C, todavia, o aumento gradativo de temperatura não é capaz de promover a saída do parasita.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKAHEM, H. F., AHMED, Z., AL-AKEJ, A. S., SHAMSI, M. J. K. Toxicity Bioassay and Changes in Haematological Parameters of *Oreochromis niloticus* Induced by Trichlorfon. Arab Gulf J. Scient. Res., 17 (I). 1999.

ALVES, D. R.; LUQUE J. L.; PARAGUASSÚ A. R., Metacercárias de *Clinostomum marginatum* (Digenea: Clinostomidae) em acará-bandeira *Pterophyllum scalare* (Osteichthyes: Cichlidae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Parasitologia Al Dia, v.25, p. 70-72, 2001.

ALVES, D. R.; LUQUE, J. L.; MARQUES, F. A. Ocorrência de *Camallanus cotti* (Nematoda: Camallanidae) parasitando o guppy, *Poecilia reticulata* (Osteichthyes: Poeciliidae). Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida, v. 22, p. 77-79, 2000.

AOHAGI Y, SHIBAHARA T, MACHIDA N, YAMAGA Y, KAGOTA K, HAYASHI T. Natural infections of *Clinostomum complanatum* (Trematoda: Clinostomatidae) in wild herons and egrets, Tottori Prefecture, Japan. J Wildl Dis. V.28:470–471. 1992.

ARAÚJO, Cleusa Suzana Oliveira de et al . Parasitas de populações naturais e artificiais de tucunaré (*Cichla* spp.). Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Online), Jaboticabal, v. 18, n. 1, Mar. 2009 .

AXEROLD, H. R. The most complete colored lexicon of cichlids. Tropical Fish Hobbyist Publications, Inc., Neptune City, New Jersey, 863p., 1993.

BALDISSEROTO, Bernardo. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 3 ed. Santa Maria: Ed UFSM. 352p. 2013.

BALDISSEROTTO, Bernardo; GOMES, Levy de Carvalho. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: UFSM, 2005. Cap. 17, p. 393-401.

BARCELLOS, L. J. F.; FERREIRA, D. M., Workshop sobre jundiá: História e Perspectivas. Ed. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.

BARROS C. S. L., DRIEMEIER D., DUTRA I. S., LEMOS R. A. A. Doenças do Sistema Nervoso de Bovinos no Brasil: Coleção Vallée. AGNS, São Paulo. 207p. 2006.

BARROS, C. S. L. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino. Cap. 4 In__ Patologia Veterinária. São Paulo, Roca. pp183-290. 2010.

BASU, M.; LENKA, S. S.; PAICHHA, M.; SWAIN, B.; PATEL, B.; BANERJEE, R. JAYASANKAR, P.; DAS, S.; SAMANTA, M. Immunoglobulin (Ig) in *Labeo rohita* is widely expressed and differentially modulated in viral bacterial and parasitic antigenic challenges. *Veterinary immunology and immunopathology*. Vol. 179 p. 77-84. 2016.

BATISTA, R.C. *Monogeneas de Hoplias malabaricus no Lago do João Bedim em Itaperuna - RJ*. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas como parte dos requisitos a obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas. 34p. 2016.

BERNARDINO, M. G. S.; SILVA, E. G.; BEZERRA, T. I. C.; LUCENA, R. B.; SATAKE, F. Avaliação ectoparasitológica, hematológica e histopatológica de traíras *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 provenientes de açudes localizados no município de Sumé, estado da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras*. Vol. 36 (7). 2016.

BOVECTIN: Ivermectina, R.T.: Jairo de Almeida Utimi. São Paulo: Eurofarma. 2010, Bula de remédio.

BUCHMANN, K.; KOIE, M.; PRENTØ, P. The nutrition of the gill parasitic monogenean *Pseudodactylogyrus anguillae*. *Parasitol. Res*. 73, 532-537. 1987.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aquicultura - um mercado em expansão. *Revista Brasileira de Agrociência*, vol. 11(4): 393-396, 2005.

CANO, I.; VERNER-JEFFREYS, D. W.; VAN AERLE, R.; PALEY, R. K.; PEELER, E. J.; GREEN, M.; RIMMER, G. S. E.; SAVAGE, J.; JOINER, C. L.; BAYLEY, A. E.; MEWETT, J.; HULLAND, J.; FREIST, S. W. Puffy skin disease is an emerging transmissible condition in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *PLoS ONE* vol. 11 (7), p. 1-17. 2016.

CARLSSON, G., PATRING, J., KREUGER, J., NORRGREN, L., OSKARSSON, A. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat. Toxicol*. 126. pp. 30-41. 2013.

CARVALHO, A.R.; TAVARES, L.E.R.; LUQUE, J.L. Variação sazonal dos metazoários parasitos de *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae) no Rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Scie Biol Sci*. 32(2): 159-167. 2010.

CHAPMAN, F. A.; FITZ-COY, S.; THUNBERG, J. T.. United States of America Internacional Trade in ornamental fish. Journal World Aquaculture Society, Baton Rouge, v. 28, n. 1, p.1-10, 1997.

CHOUDHURY, C.; HOFFNAGLE, T. L.; COLE, R. A. Parasites of native and nonnative fishes of the little colorado river, grand canyon, Arizona. Journal of Parasitology, vol 90(5)p. 1042-1053. 2004.

CLEMENTE, S. C. S.; PERALTA, A. S. L.; CARVALHO JR., J. R.; MESQUITA, E. F. M.; MATOS, E. *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa) in *Gasteropelecus sternicola* (Linnaeus, 1758) collected in the área of Belém, state of Pará, Brazil. Parasitol. Dia v.24 n1-2 Santiago ene. 2000.

DA SILVA, A. S., PEDRON, F. A., ZANETTE, R. A., MONTEIRO, S.G., NETO, J. R. Eficácia do praziquantel no controle ao parasito *Cinostomum complanatum* Rudolphi, 1918 (Digenea, Clinostomidae) em peixes da espécie *Rhamdia quelen* Quoy e Gaimard, 1824 (Jundiá). Pesq. Agrop. Gaúcha, v. 15, n 1 pp. 73-76. 2009.

DALY, JAMES J.; CONAWAY, HOWARD H.; HOSTETLER, TERRY L.; MATTHEWS, H. MICHAEL. *Clinostomum marginatum* metacercaria: Incidence in Smallmouth Bass from a North Arkansas Stream and in vitro Oxygen Consumption Studies. Journal of the Arkansas Academy of Science: Vol. 41 , Article 10. 1987.

DAVIES, I. M., McHENERY, J. G., RAE, G. H. Environmental risk from dissolved ivermectin to marine organisms. Oceanographic Literature Review. 45 (7) p 1219. 1998.

DEGANI, G., Growth and body composition of juveniles of *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) (Pisces; Cichlidae) at different densities and diets. Aquaculture and Fisheries Management, 24 (6), p. 725-730, 1993.

DELAYTE, E. H., OTSUKA, M., LARSSON, C. E., CASTRO, R.C.C. Eficácia das lactones macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicose canina generalizada. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.58, n.1, p.31-38, 2006.

DIAS, P.G. et al. Carga parasitária de Rondonia rondoni, Travassos, 1920 (Nematoda, Atractidae) e fator de condição do armado, *Pterodoras granulosus*, Valenciennes, 1833 (Pisces, Doradidae). Acta Scientiarum. Biological Sciences, v.26, n.2, p.151-156, 2004.

- DIAS, R. L.; CHELLAPA, S.. Desenvolvimento gonadal do ciclídeo ornamental acará-bandeira, *Pterophyllum scalare*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA DO BRASIL, 12., 2003, Goiânia. Anais... . Goiânia: (Eds. Urbinati, E. C.; Cyrino, J. E. P.), 2003. p. 135 - 148.
- DIAS-GRIGÓRIO, M.K.R.; *Diversidade parasitária e relação parasito-hospedeiro em Colossoma macropomum e seu híbrido Tambatinga cultivados em Macapá, Estado do Amapá*. Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical. 100F. 2013.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, C. G. Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil. Maringá: Editora Clichetec. 333p. 2010.
- ESCRIBANO, M., SAN ANDRES, I. M., DE LUDAS, J. J., GONZALES-CANGA, A. Ivermectin residue depletion in food producing species and its presence in animal foodstuffs with a view human safety. Current Pharmaceutical Biotechnology. V13 n 6. Pp987-998. 2012.
- EVANS, B. B.; LESTER, R. J. G. Parasites of ornamental fish imported to Australia. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, v. 21, n. 2, p. 51-55, 2001.
- FANTA, E. RIOS, F. S. A., ROMÃO, S., VIANNA, A. C. C., FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicology and Environmental Safety v54 pp. 119–130. 2003.
- FERRAZ, E. Management and diseases of the ornamental fish exported from the Rio Negro basin. In: VAL, A. L.; VAL, V. M. F. A. (Ed.). Biology of tropical fishes. Manaus: INPA, p. 99-111. 1999.
- FETHERMAN, E. R.; WINKELMAN, D. L.; BAERWALD, M. R.; SCHISLE, G. J. Survivor and reproduction of *Myxobolus cerebralis* – resistant rainbow trout introduced to the Colorado river and increased resistance of age-0 progeny. PLOS ONE. Vol 9(5) p. 1-12. 2014.
- FUJIMOTO, R. Y.; DOS ANJOS, E. C. S.; RAMOS, F. M.; MARTINS, M. L. Sazonalidade de larvas de nematoide em *Iguanodectes spilurus* (Characidae) um peixe ornamental no nordeste do Pará, Brasil. Acta Amaz. Vol 43 (4), 2013.
- FUJIMOTO, R. Y.; VENDRUSCOLO, L.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R. Avaliação de três diferentes métodos para o controle de monogênicos e *Capillaria*

- sp. (Nematoda: Capillariidae) parasitos de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare* Liechtenstein, 1823). Boletim do Instituto de Pesca, v. 32, n. 2, p. 183-190, 2006.
- GALAVIZ-SILVA, L.; MOLINA-GARZA, Z.J.; ESCOBAR-GONZALEZ, B.; IRUEGAS-BUENTELLO, F. J. Metazoan parasites of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) de tre presas en Nuevo León, México. Hidrobiológica, vol 23 (3), p. 394-398. 2013.
- GALLANI, S. U.; SEBASTIÃO, S. A.; VALLADÃO, G. M. R.; BORATTI, A. Z.; PILARSKI, F. Pathogenesis of mixed infection by *Spironucleus* sp. And *Citrobacter freundii* in freshwater angelfish *Pterophyllum scalare*. Microbial Pathogenesis. Vol. 100, p. 119-123. 2016.
- GARCIA, F.; FUGIMOTO, R.Y.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Parasitos protozoários de *Xiphophorus* sp. (Poeciliidae) e a relação deles com as características da água. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 61, n.1, p. 156-162, 2009.
- GARCIA, F.; FUJIMOTO, R. Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Parasitismo de *Xiphophorus* spp. Por *Urocleidoides* sp. e sua relação com os parâmetros hídricos. Boletim do Instituto de Pesca, v. 29, n. 2, p. 123-131, 2003.
- GEETS, A., LIEWES, E., OLLEVIER, F. Efficacy of some anthelmintics against the swimbladder nematode anguillicola-crassus of eel *Anguilla-anguilla* under saltwater conditions. Dis. Aquat. Organ., v 13. Pp. 123-128. 1992.
- GONÇALVES, E.L.T. *Fauna parasitária de Tilápia do Nilo mantida em diferentes sistemas de piscicultura no Estado de Santa Catarina, Brasil*. Dissertação (Graduação em Aquicultura/Centro de Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 30p. 2008.
- GRAÇA, R.J.; MACHADO, M.H. Ocorrência e aspectos ecológicos de metazoários parasitos de peixes do Lago do Parque do Ingá, Maringá, Estado do Paraná. Maringá. *Acta Sci Biol Sci*. 29(3): 321- 326. 2007.
- GRANATH, Willard. Effects of Habitat Alteration on the Epizootiology of *Myxobolus cerebralis*, the Causative Agent of Salmonid Whirling Disease. Journal of parasitology. 100 (2) p. 157-165. 2014.
- GUIMARÃES, A. T. B., SILVA DE ASSIS, H. C., BOEGER, W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish

Oreochromis niloticus. ecotoxicology and Environmental Safety. V 68 (1) pp 57-62. 2007.

GUSTINELLI, A.; MENCONI, V.; PREARO, M.; CAFFARA, M.; RIGHETTI, M.; SCANZIO, T.; RAGLIO, A.; FIORAVANTI, M. L. Prevalence of *Diphyllbothrium latum* (Cestoda: Diphyllbothriidae) plerocercoids in fish species from four Italian lakes and risk for the consumers. International journal of food microbiology. vol:235 pg:109 -112. 2016.

HALLEY, B. A., JACOB, T. A., LU, A. Y. H. The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. Chemosphere. v 18. Pp. 1543-1563. 1989.

HALLORAN O. J., CARPENTER, J., OGDEN, D., HOGANS, W. E., JANSEN, M. Atlantic Canada. *Ergasilus labracis* on Atlantic salmon Can Vet J. 1992 January; 33(1): 75.

HEUKELBACH, J., Oliveida, F. A. S., FELDMEIER, H. Ectoparasitoses e saúde pública no Brasil: desafios para controle. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v 19 (5): 1535-1540. 2003.

HOY, T. H., NAFSTAD, I. The disposition of ivermectina in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). Pharmacology e Toxicology, 67: 307-312. 1990.

IKEDA, A. k., ZUANON, J. A. S., Salaro, a.l., FREITAS, M. B. D., PONTES, M. D., SOUZA, L. S., SANTOS, M. V. Vegetables oil in diets for freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*, Cichlidae): grow and thermal tolerance. Arq. Bras. Med Vet. Zootec., v. 63, n 3, p. 670 – 677, 2011.

ISHIKAWA, Marcia Mayumy; SILVA, Mariana S. Guerra; PÁDUA, Santiabo Benites; OLIVEIRA. Jefferson Alcântara; DIAS, Dráuzio Villa Lobo; SOUZA, Bruno Henrique. Procedimentos básicos para monitoramento da parasitofauna de peixes. EMBRAPA. Jaguariúna-SP. Circular técnica número 24. 2016.

IVOMEC, Solução oral: Ivermectina, R.T.:Emílio C. Salani, Paulina-SP: Merial, 2014, Bula de remédio.

IWASHITA, Marina Keiko Pieroni; MACIEL, Patricia Oliveira. Princípios básicos de sanidade de peixes. (Org.) Piscicultura de água doce: Multiplicando Conhecimentos. Brasília, DF : Embrapa, 2013. p. 215-272.

KALANTAN, A. M. N. e ARFIN, M. *In vitro* Excystation of Metacercariae of *Cinostomum complanatum* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Clinostomatidae). *Acta Zoológica* (Stockh.). vol 69. N. 3. Pp 163-167. 1988.

KIM, J. H.; HAYWARD, C. J; HEO, G. J. Nematode worm infections (*Camallanus cotti*, Camallanidae) in guppies (*Poecilia reticulata*) imported to Korea. *Aquaculture*, v. 205, p. 231-235, 2002.

KITAGAWA, Norihito., ODA, Mayuko., TOTOKI, Tadahide., WASHIZAKI, Seiji., ODA, Masamichi., KIFUNE, Teiji. Lidocaine spray used to capture a live clinostomum parasite causing human laryngitis. *American Journal of Otolaryngology*. Vol. 24 (5) pp 341-343. 2003.

KOHN, A.; COHEN, S. C.; JUSTO, M. C. N.; FERNANDES, B. M. M. *Didenea* cap. 16 In___*Parasitologia de peixes de água doce do Brasil*. Maringá. Eduem. P.301-316. 2013.

KOYUNCU, Erkin; CENGIZLER, İbrahim. Mersin Bölgesinde Yetiştiriciliği Yapılan Bazı Akvaryum Balıkları (*Poecilidae*)'nda Rastlanılan Protozoan Ektoparazitler. *Journal of Fisheries e aquatic sciences*. Vol. 19 (3) p.293-301.2002.

KUBITZA, F., KUBITZA L.M.M. *Principais parasitoses e Doenças dos Peixes Cultivados*. Copyright 4ed. Jundiaí, SP. 118p. 2004.

KUMAR, A. A.; RAMESHKUMAR, G. RAVICHANDRAN, S. PRIYA, E. R.; NAGARAJAN, R.; LENG, A. G. K. Occurrence of cymothoid isopod from Miri, East Malaysian marine fishes. *J. Parasit. Dis*. Vol 39 (2), p. 206-210. 2015.

LEE, G. S.; PARK, S. W.; KIM, J.; SEO, K. S.; YOU, K. W.; CHUNG, J. H.; MOON, H. C.; HONG, G. Y. A case of endoscopically treated laryngitis resulting from *Clindostomum complanatum* infection. *Korean Society of Gastroenterology*. V. 69 (3). P. 177-180. 2017.

LEUNG T.L.F.; BATES A.E. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. *J. Appl. Ecol*. 50: 215 – 222. 2012.

LIM, L. C.; DHERT, P.; SORGELOOS, P. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. *Aquaculture Research*, v. 34, p. 923-935, 2003.

LIMA, H. L., STEFANI, L. M., PEDRON, F. A., BALDISSERA, M. D., SILVA, A. S. Pro-inflammatory Cytokines in the Serum of Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Naturally Infected by *Clinostomum complanatum*: A Preliminary Study. *Journal of Parasitology*. 100 (1):142-143. 2014

LIU, P., LIN, J., CHUANG, W., LEE, K. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, (5), p.495–499. 2004.

LO, Chu-Fang ; WANG, Chung-Hsiung ; OGAWA, Kazuo ; WAKABAYASHI, Hisatsugu. The mechanism of the metacercarial excystment of *Clinostomum complanatum* (Rud. 1814). *Fish Pathology*. Vol.22(4), pp.227-235. 1987.

LO, Chu-Fang., HUBER, Franz., KOU, Guang- Hsiung., LO, Ching-Jen. Studies of *Clinostomum complanatum* (Rud., 1819). *Fish Pathology* v 15 (3/4) pp 219-227, 1981.

LOPES, R. B., PARAIBA, L. C., CECCARELLI, P. S., TORNISIELO, V. L. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) /chem.. n 64. Pp 56-62. 2006.

LUZIVOTTO-SANTOS, R., ELER, M., ESPINDOLA, E., VIEIRA, E. The use of pesticides in fish farms and FEE fishing enterprises from Mogi-Guaçu Catchment. *Boletim do instituto de pesca São Paulo*. Vol. 35 (3). Pp 343-358. 2009.

MARQUES, T. M.; BOEGER, W. A.; BRASIL-SATO, M. de C. Two new species of *Ergasilus* Nordmann, 1832 (Copepoda: Ergasilidae) and a redescription of *Ergasilus salmini* Thacher e Brazil-Sato, 2008 from *Salminus brasiliensis* Cuvier and *S. franciscanus* Lima e Britsky (Teleostei: Characidae) in Brazil. *Systematic Parasitology*. Vol. 90 (1) p. 81-89. 2015.

MARTINS, M.L.; GARCIA, F.; PIAZZA, R.S. e GHIRALDELLI, L.. *Camallanus maculatus* n. sp. (Nematoda: Camallanidae) in an ornamental fish *Xiphophorus maculatus* (Osteichthyes: Poeciliidae) cultivated in São Paulo State, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2007, vol.59, n.5, pp. 1224-1230. ISSN 0102-0935.

MASOTEN: Triclorfon, RT: Simone Eduardo. São Paulo. Bayer S. A.. 2017. Bula de remédio.

MATAQUEIRO, M. I., NAKAGHI, L. S. O., YAMADA, P. K., DE CAMARGO F. G. DE QUEIROZ-NETO, A., DE OLIVEIRA, G. H. Degradation, Residual Determination, and Cholinesterase Activity of Triclorfon in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (PACU) 1887. *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A*, Vol.77 (1-3), p.125-133. 2014.

MCMINN, H., Effects of the nematode parasite *Camallanus cotti* on sexual and non-sexual behaviors in guppy (*Poecilia reticulata*). *Am Zool* 30:245–249., 1990.

MEHRDANA, F.; JENSEN, H. M.; KANIA, P. W.; BUCHMANN, K. Import of exotic and zoonotic trematodes (Heterophyidae: *Centrocestus* sp.) in *Xiphophorus maculatus*: implications for ornamental fish import control in Europe. *Acta Parasitologica*. Vol 59 (2) p. 276-283. 2014.

MÉNDEZ, G. A. M., NOVOA, R. A. C., RUBIO, A. E. C., BARRAGÁN, I. S. R. Toxicity of trichlorfon exposure using an experimentally induced model with Silver Pacu (*Piaractus brachypomus*). *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Vol 9 (2): p. 190-202. 2014.

MENEZES, Rodrigo Caldas et al. *Camallanus cotti* Fujita, 1927 (Nematoda, Camallanoidea) in ornamental aquarium fishes: pathology and morphology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [online]. 2006, vol.101, n.6, pp. 683-687. ISSN 0074-0276.

MIRZAEI, M.; KHEDRI, J. GHASHGHAEI. O. J. Survey of Lernaeid in *Shizothorax zarudnyi* from Chahnimeh lakes in Sistan, Iran. *Journal of parasitic diseases*. Vol 40 (2), p. 505-509. 2014.

MLADINEO, I., MARSIC-LUCIC, J., BUZANCIC, M. Toxicity and gross pathology of ivermectin bath treatment in sea bream *Sparus aurata*, L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 63 (3) pp 438-442.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. *In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, p. 343-383, 2004.*

MOUTON, A.; BASSON, L.; IMPSON, D. Health status of ornamental freshwater fishes imported to South África: a pilot study. *Aquarium Sciences and Conservation*, v. 3, p. 327-333, 2001.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil 2010*. Brasília, DF, 128p. 2012.

NOGA, E. J., *Fish disease: diagnosis and treatment*. Iowa, EUA, Wiley-Blackwell, 2 ed., 519p. 2010.

OLIVEIRA, R., GRISOLIA, C. K., MONTEIRO, M. S., SOARES, A. M. V. M., DOMINGUES, I. Multilevel assessment of ivermectin effects using different zebrafish life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Pt.C, Toxicology and pharmacology*. Vol 187. Pp 50-61. 2016.

ONAKA, Eduardo Makoto. Principais parasitoses em peixes de água doce no Brasil. In___*Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. EMBRAPA, Amapá. Capítulo 21. p. 536-574. 2009.

PALMER, R.; RODGER, H.; DRINAN, E.; DWYER, C.; SMITH, P.R. Preliminary trials on the efficacy of ivermectin against parasitic copepods of Atlantic salmon. *Bull. Eur. Assn. Fish P.* 7(2), pp 47- 54. 1987.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3. ed., Maringá, Eduem, 2008.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; YAMAGUCHI, M. U.; TAKEMOTO, R. M. *Zoonoses humanas transmissíveis por peixes no Brasil*. Maringá. UniCesumar. 145pp. 2015.

PEREIRA, F. E. L. Degenerações / morte celular. Cap. 5 In___ *Bobliolo Patologia geral*. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara koogan pp. 119-146. 2013.

PÉREZ, E.; DIAZ, F.; ESPINA, S. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) (Pisces: Cichlidae). *J. Therm. Biol.*, v.28, pp.531-537. 2003.

PIAZZA, R.; MARTINS, M. L.; GUIRALDELLI, L.; YAMASHITA, M. M. Parasitic diseases of freshwater ornamental fishes commercialized in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 32, n. 1, p. 51-57, 2006.

PONPORNPIKIT, A.; ENDO, M.; MURATA, H. Experimental infections of a ciliate *Tetrahymena pyriformis* on ornamental fishes. *Fisheries Science*. Volume 66, Issue 6 Pages 1026-1031. 2000.

REAVILL, D. H.; ROBERTS, H. Diagnostic cytology of fish. Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice. Vol. 10 (1) p. 207-234. 2007.

RIBEIRO FAS, JBK FERNANDES. Sistemas de Criação de Peixes Ornamentais. Panor Aqüic 18, 34-39. 2008.

RIZVI, A., ALAN, M. M., PARVEEN, S., SALEEMUDDIN, M. ABIDI, S. M. A. Abandoning the ship: spontaneous mass exodus of *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) progenetic metecercariae from the dying intermediate host *Trichogaster fasciatus* (Bloch & Schneider, 1801). Journal of parasitic diseases. Vol. 36 (1). Pp 139-140. 2012.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; PÉREZ-COGOLLO, L. C.; ROSADO-AGUILAR, J. A.; OJEDA-CHI, M. M.; TRINIDAD-MARTINEZ, I.; MILLER, R. J. KLAFKE, G. Rhipicephalus (Boophilus) microplus resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 23 (2) pp. 113-122. 2014.

ROJAS, M. C., MOYA, K. C., NASCIMENTO, M. G. Consumo de oxígeno em *Perumytilus purpuratus* según El parasitismo por Digenea, y efectos de La temperatura y Del ciclo de emersion-inmersión sobre La liberación de cercarias. Ver. Biol. Mar. Oceanogr. Vol. 50 n 2. 2015.

ROSSER, T. G.; ALBERSON, N. R.; WOODYARD, E. T.; CUNNIGHAM, F. L.; POTE, L. M.; GRIFFIN, M. J. *Clinostomum album* n. sp. And *Clinostomum marginatum* (Rudolphi, 1819), parasites of the great egret *Ardea alba* L. from Mississippi, USA. Systematic Parasitology. V. 94. Issue 1. Pp 35-49. 2017.

SADRINEJAD, A.; KHARA, H.; GUDARZI, M. Investigation of parasites of pikes (*Esox lucius* Linnaeus, 1785) from Chamkhale river, Anzali and Amirkelayeh wetlands, Iran. J. Parasit. Dis. Vol 40 (3), p. 1033-1037. 2016.

SANDERSON, H., LAIRD, B., POPE, L., BRAIN, R., WILSON, C., JOHNSON, D., BRYNING, G. PEREGRINE, A. S., BOXALL, A., SOLOMON, K. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. Aquatic Toxicology. 85. Pp 229-240. 2007.

SANTOS, Cláudia Portes; LOPES, Karina Corrêa; Costa, Viviane da Silva; SANTOS, Everton Gustavo Nunes. Fish-borne trematodosis: Potential risk os infection by *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Heterophyidae). Veterinary parasitology. volume 193. p. 302-306. 2013.

SANTOS, E. Peixes de água doce: Vida e costume dos peixes do Brasil. Belo Horizonte: Itatiaia, 1981. 267p.

SANTOS, E.F.; TAVARES-DIAS, M.; PINHEIRO, D.A.; NEVES, L.R. MARINHO, R.G.B.; DIAS, M.K.R. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. *Acta Amazonica*, v. 43, p. 107-114, 2013.

SAQIB, M.; ABBAS, G.; MUGHAL, M. M. successful management of ivermectin-induced blindness in a African lion (*Panthera leo*) by intravenous administration of a lipid emulsion. *BMC Veterinary research*. v.10 (1). P. 262. 2015.

SAURABH, S.; MOHANTY, B. R. SAHOO, P. K. Expression of immune-related genes in rohu *Labeo rohita*(Hamilton) by experimental freshwater lice *Argulus siamensis*(Wilson) infection. *Veterinary parasitology*. Vol 175 (1-2), p. 119-128. 2011.

SHAREEF, P. A.; ABIDI, S. M. A. Incidence and histopathology of encysted progenetic metacercaria of *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) in *Channa punctatus* and its development in experimental host. *Asian Pac J Trop Biomed*. V. 2 (6). pp 421-426. 2012.

SILVA, A. S., MONTEIRO, S. G., DOYLE, R. L., PEDRON, F. A., FILIPETTO, J. E., RADUNZ-NETO, J. Ocorrência de *Clinostomum complanatum* em diferentes espécies de peixes de uma piscicultura do Município de Santa Maria – RS. *Veterinaria e Zootecnia* 15, 27–32. 2008.

SILVA, Camila Figueira; SATO, Marcello Otake. Controle sanitário em peixes ornamentais amazônicos: Avaliação dos métodos de extração e purificação de DNA Genômico de adultos, imaturos e metacercárias de Heterophiideos de peixes ornamentais amazônicos. Resumo expandido, 38° Conbravet. 2011.

SINGHAL, R.N.; JEET, S.; DAVIES, R.W. The relationships between changes in selected physico-chemical properties of water and the occurrence of fish parasites in Haryana, India. *Trop Ecol*. 27: 1 - 9. 1986.

SOUSA, V. F.; ROCHA, C. A. M. 2005. Estudo da ocorrência de parasitas em peixes teleosteo de água doce da Amazônia. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 57 – Fortaleza, CE, 2005. Anais. Fortaleza, 2005.

SUTILI, F. J., GRESSLER, L. T., VILANI DE PELEGRINI, L. F. *Clinostomum complanatum* (Trematoda, Digenea): a parasite of birds and fishes with zoonotic

potential in southern Brazil. A review. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 8, 99–114. 2014.

TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P.; GUIDELLI, G.M. *Parasitas de peixes de águas continentais*. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. Sanidade de organismos aquáticos. Editora Varela. São Paulo; p. 179 - 197. 2004.

TAVARES-DIAS, M.; BRITO, M.L.S.; LEMOS, J.R.G. Protozoários e metazoários parasitos do cardinal *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Characidae), peixe ornamental proveniente de exportador de Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.*, Maringá, vol. 31, n. 1, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; LEMOS, J. R. G. MARTINS, M. L.; JERÔNIMO, G. T. Metazoan and protozoan parasites of freshwater ornamental fish from Brasil. In: Manejo e sanidade de peixes em cultivo. EMBRAPA, Amapá. Capítulo 19. p. 469-494. 2009.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesquepagues” do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, supl. 1, p. 67-79, 2000.

TAVARES-DIAS, Marcos; LEMOS, Jefferson Raphael Gonzaga and MARTINS, Maurício Laterça. Parasitic fauna of eight species of ornamental freshwater fish species from the middle Negro River in the Brazilian Amazon Region. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* (Online) [online]. 2010, vol.19, n.2, pp. 103-107. ISSN 1984-2961.

TAVECHIO, W. L. G. *Alternativas para a prevenção e o controle de parasitas de peixes ornamentais*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 39- f. 2010.

THATCHER, V. E. *Amazon Fish Parasites*. 2ª. Ed. Pensoft Publishers Sofia-Moscow. 2006.

UEDA, B.; KARLING, L.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. Parasites of the freshwater fish trade in Brazil: science metric. *Pesq. Vet. Bras.* 33(7):851-854, julho 2013.

VALLADÃO, G. M. R.; GIANNECCHINI, L. G.; MARTINS, M. L.; PÁDUA, S.B. *Trichodina modesta*: an exotic ciliate in the Neotropical region parasitizing an unusual host. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* vol.24 no.2 Jaboticabal. 2015.

VARÓ, I., RIGOS, G., NAVARRO, J. C., DEL RAMO, J., CALDUCH-GINER, J., HERNÁNDEZ, A., PERTUSA, J., TORREBLANCA, A. Effect of ivermectin on the liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*: A proteomic approach. *Chemosphere*. Vol 80 (5). pp 570-577. 2010.

VEIGA, M. L., RODRIGUES, E. L., PACHECO, F. J., RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic Changes in the Kidney Tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) Induced by Sublethal Concentration of Trichlorfon Exposure. *Brazilian archives of biology and technology*. Vol 45. n 2. 2002

VENTURA, A. S.; Ishikawa, M. M.; Gabriel, A. M. A.; Silbiger, H. L. N.; Cavichiolo, F.; takemoto, R. M. Histopathology from liver of tuvira (*Gymnotus* spp.) parasitized by larvae of nematodes/ Histopatologia de fígado de tuvira parasitado por larvas de nematoides. *Ciência Rural*. Vol. 46 (7), p.1233. 2016

VENTURINI, F. P. Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887) exposto a concentração subletal de triclorfon e recuperação. (Dissertação) Universidade Federal de São Carlos. 78p. 2010.

VIDAL Jr., M. V. *A produção aquícola de peixes ornamentais*. In: VII Seminário de Aves e Suínos e III Seminário de Aqüicultura, Maricultura e Pesca, Belo Horizonte, MG, p. 63-74, 2007.

VIDAL JUNIOR, M.V. (2005) peixes ornamentais: Acará Bandeira. *Panorama da Aqüicultura*, n. 87, v.15, p.57-61.

VIJAYAKUMAR, R.; RAJA, K. VELVIZHI, S.; SINDUJA, K.; GOPALAKRISHNAN, A. Occurrence of heavy copepod infestation on *Hemiramphus lutkei* and double parasitisms on *Hemiramphus far* with copepod (*Lernaeenicus hemiramphi*) and isopod (*Mothocya plagulophora*). *J Parasit Dis* VOL. 38 (3), P. 331-333. 2014.

VILIZZI, L. TARKAN, A. S.; EKMEKCI, F. G. Parasites of the common carp *Cyprinus carpio* L., 1758 (Teleostei: Cyprinidae) from water bodies of Turkey: updated checklist and review for the 1964-2014 period. *Turkish journal of zoology*, vol.39 (4) p. 545-554. 2015.

VITAL, J.F.; VARELLA, A.M.B.; PORTO, D.B.; MALTA, J.C.O. Sazonalidade da fauna de metazoários de *Pygocentrus nattereri* (Kner, 1858) no Lago Piranha (Amazonas, Brasil) e a avaliação de seu potencial como indicadora da saúde do ambiente. *Biota Neotrop*. 11(1): 199 – 204. 2011.

WANG, MAO-LIN., CHEN, HUI-YU., SHIH, HSIU-HUI. Occurrence and distribution of yellow grub trematodes (*Clinostomum complanatum*) infection in Taiwan. Parasitol Res. 116:1761-1771. 2017.

WELKER, J. S., ROSA, A.P., MOURA, D.J., MACHADO, L.P., CATELAN, F. UTTPATEL, R. Temperatura corporal de frangos de corte em diferentes sistemas de climatização. R. Bras. Zootec. Vol. 37 n 8. 2008.

WERNER, P. R. Patologia geral veterinária aplicada. São Paulo, Roca, 371p. 2015.
WU, S.; WANG, G.; GAO, D.; XI, B.; YAO, W.; LIU, M. Occurrence of *Camallanus cotti* in greatly diverse fish species from Danjiangkou Reservoir in central China. Parasitol Res., 2007, 101 p. 467-471.

YAMADA, F. H.; MOREIRA, L. H. A.; CESCHINI, T. L.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Novas ocorrências de metacercária de *austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (Platyhelminthes: Digenea) parasito de olhos de peixes da bacia do rio Paraná. Ver. Bras. Parasitol. Vet. Vol. 17(3), p. 163-166. 2008.

ZACHARY, J. F. Nervous System. In:___Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4 ed. Pp 914-915. Mosby Elsevier, St Louis. 2007.