

EFECTOS DEL CARBOFURAN EN JUVENILES DE *Oreochromis niloticus* EN LA TOXICIDAD, METABOLISMO DE RUTINA Y PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Edison BARBIERI¹, Karla RUIZ-HIDALGO², Karina Fernandes Oliveira REZENDE³,
Antônio Fernando Gervásio LEONARDO⁴, Francisco Pérez SABINO⁵

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue estimar la toxicidad del **pesticidas** carbofurán sobre los parámetros hematológicos (hematocrito, hemoglobina, **glucosa en la sangre** y conteo de eritrocitos y leucocitos totales), sobre la excreción de amoníaco y el consumo de oxígeno en individuos juveniles de *Oreochromis niloticus* (longitud total: $12\pm 0,5$ mm). Los espécimenes fueron expuestos a diferentes concentraciones del plaguicida carbofurán (0, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, y 4,0 mg L⁻¹), a diferentes temperaturas (15, 20 y 25 °C) y pH 7. Los valores de LC50 en períodos de 24, 48, 72, 96 h para los juveniles de *O. niloticus* expuestos al carbofurán fueron 3,00; 2,84; 2,71 e 2,45 mg L⁻¹ para 15 °C; 3,00; 2,69; 2,33 e 2,20 mg L⁻¹ para 20 °C; y 2,84; 2,44; 1,71; 1,62 mg L⁻¹ para 25 °C, respectivamente. Los resultados evidenciaron que con el aumento de la temperatura de 15 a 25 °C hubo un aumento de la sensibilidad de los peces al carbofurán de 21,80%, 9,55%, 31,92% y 30,87%, después de 24, 48, 72 y 96 h de exposición, respectivamente. Por otra parte, se observó que en peces expuestos al carbofurán en concentración de 2 mg L⁻¹ ocurrió una disminución en la tasa de hemoglobina total y una elevación en la tasa de glucosa sanguínea, consumo de oxígeno y excreción de amonio. Estos resultados indican que la exposición al carbofurán, especialmente a altas temperaturas es un factor significativo a ser considerado en el manejo de la acuicultura.

Palabras clave: carbofurán; tilapia; *Oreochromis niloticus*; temperatura; toxicidad.

EFFECT OF CARBOFURAN PESTICIDE IN JUVENIL *Oreochromis niloticus* ON TOXICITY, ROUTINE METABOLISM AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS

ABSTRACT

Oreochromis niloticus juveniles (total length 12 ± 0.5 mm) were exposed to different concentrations of carbofuran, using the static renewal method at different temperatures (15, 20 and 25°C) at pH 7. The 24, 48, 72, 96 h LC50 values of carbofuran in *Oreochromis niloticus* juveniles were 3.00, 2.84, 2.71 and 2.45 mg L⁻¹ at 15°C; 3.00, 2.69, 2.33 and 2.20 mg L⁻¹ at 20°C; and 2.84, 2.44, 1.71 and 1.62 mg L⁻¹ at 25°C, respectively. Results show that a temperature increment from 15 to 25°C increased the carbofuran susceptibility in fish by 21.80%, 9.55%, 31.92% and 30.87%, after 24, 48, 72 and 96 hours of exposure, respectively. Furthermore, we found that exposure of fish to carbofuran caused an elevation in total hemoglobin and blood glucose concentration of 2 mg L⁻¹. These results indicate that exposure to carbofuran, especially at lower temperatures is a significant factor to be considered in aquaculture management.

Keywords: carbofuran; tilapia; *Oreochromis niloticus*; temperature; toxicity.

Artigo Científico: Recebido em 03/05/2017; **Aprovado em** 05/09/2017

¹ Instituto de Pesca – APTA – SAA/SP. Caixa Postal 157. Av. Prof. Besnard s/n., 11990-000. Cananéia, SP, Brazil. E-mail: edisonbarbieri@yahoo.com.br (corresponding author)

² Laboratorio de Ecotoxicología - Centro de Investigación en Contaminación Ambiental - Universidad de Costa Rica

³ Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. CEP 05508-900. São Paulo. Brazil.

⁴ Polo Regional de Pariquera-açu – APTA – Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

⁵ Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

INTRODUCCIÓN

Estudios de la toxicidad del carbofurán en peces de agua dulce neotropical son escasos debido a que la introducción del cultivo de peces de agua dulce es reciente en Brasil, siendo representada la mayor parte de la producción nacional por especies exóticas como la carpa y la tilapia (FRACALOSSO *et al.*, 2004).

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) es actualmente la especie de peces más comúnmente cultivada en Brasil y una de las primeras especies cultivadas que son procesadas y comercializadas como filetes congelados (ARRUDA, 2004; COA *et al.*, 2017). En los estanques de acuicultura, la tilapia se encuentra en riesgo de ser atacada por depredadores o parásitos, por lo que se utilizan plaguicidas organofosforados para ayudar a prevenirlo (PATHIRATNE y GEORGE, 1998). Además, la aplicación de plaguicidas en la agricultura en áreas cercanas a humedales o tanques ha resultado en el envenenamiento de muchas especies no blanco tales como peces e invertebrados acuáticos (STRAUSS y CHAMBERS, 1995; CARR y CHAMBERS, 1996; BARBIERI, 2009).

El carbofurán es un plaguicida comercial ampliamente utilizado en estanques para eliminar nematodos (PATHIRATNE y GEORGE, 1998; AGUIAR *et al.*, 2004), resultando en contaminación ambiental general así como en el envenenamiento de humanos y fauna (AGUIAR *et al.*, 2004; JYOTHI *et al.*, 1999). Esta contaminación de reservorios acuáticos por plaguicidas es una posible causa de desequilibrio ambiental y envenenamiento de peces y otras especies acuáticas (HANSEN *et al.*, 1997; AGUIAR *et al.*, 2004; BARBIERI *et al.*, 2016).

Los estudios para evaluar la toxicidad de sustancias químicas liberadas en sistemas acuáticos son útiles para determinar el impacto que pueden causar en la biota acuática. Existen diferentes marcadores fisiológicos con potencial para el estudio de la toxicidad de sustancias químicas (ADAMS, 1990; SANTOS *et al.*, 2014), incluyendo el metabolismo de los peces que refleja las interacciones entre el organismo y su entorno y determina la condición y salud física general de los mismos, siendo indicadores sensibles a cambios ambientales (SCHEREK, 1990).

Los efectos letales del carbofurán en peces juveniles han sido estudiados en *Lepomis macrochirus* (JASH y BHATTACHARAYA, 1983), *Channa punctatus*, (HERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2011), *Dicentrarchus labrax* (BRETAUD *et al.*, 2000), *Carassius auratus* (ADHIKARI, 2004), *Labeo rohita* (BEGUM,

2004), *Clarias batrachus* (WARING, 1997), *Salmo salar* (SUKUMAR y KARPAGANAPATHY, 1992) y *Rhamdia quelen* (LEMAIRE *et al.*, 1996). Sin embargo, los autores no tienen conocimiento de trabajos similares realizados con *Oreochromis niloticus*.

En animales aeróbicos, la cuantificación de la tasa de consumo de oxígeno está directamente asociada a la cantidad de energía liberada para el mantenimiento de sus procesos vitales. El amoníaco es un contaminante común resultante de la excreción de animales y de la mineralización de desechos orgánicos, como las comidas y las heces. Por lo tanto, la evaluación del consumo de oxígeno y excreción de amonio ha sido utilizada para estudiar efectos tóxicos causados por compuestos aromáticos (CAMPOS-GARCIA *et al.*, 2016), metales pesados (WU y CHEN, 2004; DANMATO y BARBIERI, 2012), detergentes (CHRISTIANSEN *et al.*, 1998; BOUDOU y RIBEYRE, 1989), y una variedad de agentes tóxicos (BARBIERI y BONDIOLI, 2013).

También se han utilizado parámetros hematológicos para estudiar los efectos tóxicos causados por varios contaminantes (HAMILTON y RUSSO, 1977). BARBIERI y BONDIOLI (2013) afirman que la sangre revela condiciones corporales internas de los organismos, antes de que haya manifestación clínica visible, por tener una estrecha relación con el medio ambiente en que viven. De esta forma, análisis hematológicos de peces expuestos a contaminantes pueden ser importantes para evaluar y monitorear la calidad ambiental (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

El propósito del presente estudio fue estimar la toxicidad del plaguicida carbofurán y los efectos de éste en los parámetros hematológicos, excreción de amonio y consumo de oxígeno en juveniles de *O. niloticus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Carbofurán

La solución madre de carbofurán fue preparada con Furadan (Analytical standards CFN (2,2-dimetil-2,3-dihidro-1-benzofuran-7-benzofuranil-mentil carbamato, >99% purity), 3-hidroxicarbofurán (99,5%) y 3-cetocarbofurán (99,5%) obtenida de Chemservice (West Chester, Pennsylvania, USA). Se calculó la concentración para peceras de 50 L.

Delineamiento experimental y concentración letal del 50% (CL50)

Juveniles de *O. niloticus* (peso promedio húmedo: $1,2 \pm 0,3$ g; longitud total: $1,6 \pm 0,4$ cm) fueron cultivados en el laboratorio del Instituto de Pesca, São Paulo. Los peces, que se mantuvieron inicialmente en agua dulce a 15°C , fueron divididos aleatoriamente en tres grupos primarios de 90 especímenes cada

uno. Estos grupos primarios fueron utilizados para ensayar el efecto de la concentración de plaguicida a las temperaturas de 15, 20 y 25°C . El agua de las peceras se calentó a 20 y 25°C respectivamente a una velocidad de 2°C al día (Figura 1, diseño experimental).

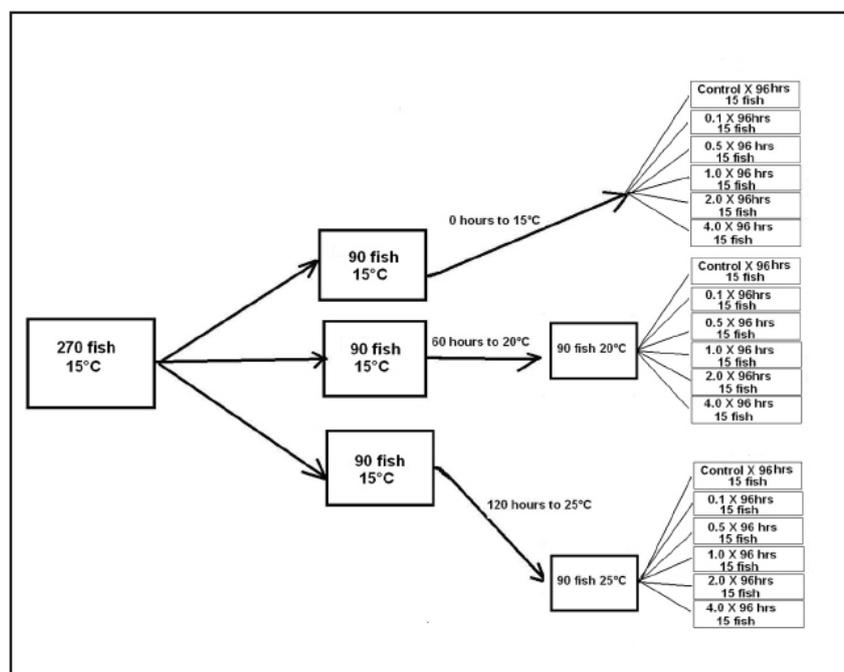


Figura 1. Diseño experimental.

La variación en la temperatura del agua se mantuvo dentro de $\pm 1^{\circ}\text{C}$, el oxígeno disuelto en $6,8 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, el rango del pH entre 6,78 y 7,15, con un promedio de 6,98, y la dureza del agua fue de $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. Una vez que las tres peceras alcanzaron la temperatura blanco, la población de peces en cada pecera fue dividida de nuevo, en 6 poblaciones de igual tamaño (15 peces) que se colocaron en peceras individuales.

Para ensayar el efecto de la concentración del plaguicida, se añadió carbofurán a las peceras correspondientes a cada temperatura para obtener concentraciones de 0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 y $4,0 \text{ mg L}^{-1}$. Esto se hizo preparando una solución madre de carbofurán de 1.000 mg L^{-1} la cual fue diluida a las concentraciones deseadas.

La concentración letal (LC50 con límites de confianza de 95%) de carbofurán fue calculada por estimaciones de Spearman-Kärber. Las concentraciones de N-amonio en las soluciones de ensayo fueron medidas usando el método descrito por SOLORZANO (1969).

En los experimentos fueron utilizadas peceras de 50 L. Los peces muertos fueron removidos de las peceras diariamente luego de 24, 48, 72 y 96 h de exposición. Durante el experimento, los peces fueron alimentados con una dieta de proteína seca al 40%, dos veces diarias (09:00 h y 16:00 h) con raciones correspondientes a 15% del peso corporal por día (BARBIERI, 2007). Se presumió la muerte cuando los peces se quedaron inmóviles y no mostraron respuesta al tocarlos con una varilla de vidrio.

Consumo de oxígeno y excreción de amonio

Ciento cincuenta peces ($3,7 \pm 0,45$ g y $2,83 \pm 0,48$ cm), fueron utilizados para las mediciones de metabolismo de rutina, utilizando respirómetros sellados. El respirómetro fue hecho en el laboratorio, utilizando un tubo acrílico y tapaderas de PVC. Diez peces fueron sometidos individualmente a mediciones de consumo de oxígeno en cada una de las cinco concentraciones de carbofurán (0; 0,5; 1,0; 2,0 y $3,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Los peces se mantuvieron inicialmente en el respirómetro con circulación de agua continua por al menos 30 min para atenuar el estrés provocado por la manipulación. El suministro de agua fue detenido cerrándose el respirómetro, de forma que los peces solamente consumieran el oxígeno inicial disuelto en el volumen de agua conocido por un período de 1 h. Los respirómetros fueron protegidos con una barrera para aislar a los peces de movimientos en el laboratorio. La diferencia entre la concentración de oxígeno en el agua al inicio y al final del confinamiento fue utilizada para calcular el consumo de oxígeno.

Para minimizar el efecto de las concentraciones bajas de oxígeno y acumulación de metabolitos, en el metabolismo, el tiempo de confinamiento del experimento fue regulado, asegurando que la concentración del oxígeno al final de los experimentos fuera de 70% de su concentración inicial. El oxígeno disuelto fue determinado por el método de WINKLER (1888). Al inicio y al final de los experimento se determinó el nitrógeno de amonio total (NAT) que fue considerado para medir las concentraciones de N-amonio por el método de SOLORZANO (1969).

Parámetros hematológicos

Los peces se distribuyeron aleatoriamente en 15 peceras conteniendo 50 L de agua, con flujo de agua y aireación constantes, alimentándose con alimento comercial (31% de proteína) durante 9 días para su adaptación. Setenta y cinco tilapias juveniles ($326,4 \pm 12,8$ g y $38,5 \pm 4,3$ cm), fueron utilizadas para la medición de parámetros hematológicos (Temperatura de 20°C). Después de 48 h de exposición a varias concentraciones de carbofurán (control; 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg L⁻¹) los animales fueron anestesiados con benzocaína (4%) y las muestras de sangre fueron obtenidas por punción caudal, con una aguja y jeringa heparinizadas. Los parámetros hematológicos fueron estimados de acuerdo a métodos clínicos de rutina (WINTROBE, 1978). El hematocrito fue determinado usando una centrífuga de microhematocritos y la concentración de hemoglobina se determinó por espectrofotometría de acuerdo al método de DRABKIN (1949). Las muestras fueron centrifugadas (12.000 rpm - 15 min) para separar el plasma, el cual, con la dilución apropiada, fue utilizado para ensayos de enzimas y determinación

de intermediarios metabólicos. La glucosa de la sangre fue analizada con un sensor de glucosa de sangre de precisión Medisense Q-I-DTM.

Análisis Estadístico

El promedio del consumo de oxígeno, excreción de amonio y parámetros hematológicos para los peces fue analizado utilizando análisis de normalidad (Shapiro-Wilk's test) y homogeneidad (Levene's test) de la variancia, en caso de que los resultados fueran normales y con homogeneidad se utilizó (ANOVA) y ensayos de comparaciones múltiples de Tukey (P<0,05).

RESULTADOS

Mortalidad

La mortalidad porcentual de *O. niloticus* expuestos a carbofurán a intervalos de 24 h es mostrada en las Tablas 1 a la 3. Ningún pez murió en las soluciones control a ninguno de los niveles de temperatura ensayados. A mayor concentración de carbofurán a la que se expusieron los peces, mayor fue la mortalidad observada. Ningún pez murió en la solución de carbofurán de 0,2 mg L⁻¹ a una temperatura de 25°C y tiempo de exposición de 72 h. Las tasas de supervivencia de juveniles de *O. niloticus* fueron significativamente diferentes (Tablas 1 a 3) para las diferentes interacciones: concentración de carbofurán y temperatura, concentración de carbofurán y tiempo de exposición, y temperatura y tiempo de exposición.

Concentración letal media

Los valores de LC50 del carbofurán a diferentes tiempos de exposición para juveniles de *O. niloticus* se muestran en las Tablas 1 a 3. A 24, 48, 72 y 96 h, los valores de LC50 de carbofurán fueron 3,00; 2,84; 2,71 y 2,45 mg L⁻¹ a 15°C; 3,00; 2,69; 2,33 y 2,20 mg L⁻¹ a 20°C; y 2,84; 2,44; 1,71 y 1,62 mg L⁻¹ a 25°C, respectivamente. Los valores de LC50 de carbofurán declinaron bruscamente durante las primeras 72 h. Conforme se incrementó la temperatura de 15°C a 25°C, la susceptibilidad al carbofurán se incrementó en 5,33%; 14,08%; 36,90% y 33,87%, después de 24, 48, 72 y 96 h de exposición respectivamente.

Tabla 1. Mortalidad porcentual (%) de *Oreochromis niloticus* expuesta a diferentes concentraciones de carbofurán por 96 h y su concentración letal media (LC50 con límite de confianza de 95%) calculada por estimación de Spearman-Kärber, para 15°C.

Tiempo de exposición (h)	Carbofurán (mg L ⁻¹)							LC50 de Carbofurán (mg L ⁻¹)
	0,0	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	
24	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	6,66	100	3,00 (2,70 - 3,32)
48	0,0	0,0	0,0	0,00	6,66	13,33	100	2,84 (2,47 - 3,27)
72	0,0	0,0	0,0	0,00	6,66	13,33	100	2,71 (2,29 - 3,21)
96	0,0	0,0	0,0	6,66	13,33	13,33	100	2,45 (1,98 - 3,04)

Tabla 2. Mortalidad porcentual (%) de *Oreochromis niloticus* expuesta a diferentes concentraciones de carbofurán por 96 h y su concentración letal media (LC50 con límite de confianza de 95%) calculada por estimación de Spearman-Kärber, para 20°C.

Tiempo de exposición (h)	Carbofurán (mg L ⁻¹)							LC50 de Carbofurán (mg L ⁻¹)
	0,0	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	
24	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	6,66	100	3,00 (2,70 - 3,32)
48	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	20,00	100	2,69 (2,28 - 3,18)
72	0,0	0,0	0,0	6,66	13,30	20,00	100	2,33 (1,85 - 2,93)
96	0,0	0,0	0,0	6,66	13,30	26,60	100	2,20 (1,73 - 2,89)

Tabla 3. Mortalidad porcentual (%) de *Oreochromis niloticus* expuesta a diferentes concentraciones de carbofurán por 96 h y su concentración letal media (LC50 con límite de confianza de 95%) calculada por estimación de Spearman-Kärber, para 25°C.

Tiempo de exposición (h)	Carbofurán (mg L ⁻¹)							LC50 de Carbofurán (mg L ⁻¹)
	0,0	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0	4,0	
24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	13,30	100	2,84 (2,47 - 3,27)
48	0,0	0,0	0,00	6,66	6,66	20,00	100	2,44 (1,96 - 3,02)
72	0,0	0,0	0,00	6,66	6,66	20,00	100	1,71 (1,25 - 2,34)
96	0,0	0,0	13,30	20,00	26,60	26,60	100	1,62 (2,17 - 2,25)

Parámetros hematológicos

Los peces sometidos a las más altas concentraciones de carbofurán presentaron valores menores de hematocrito (Figura 2).

La disminución en la cuenta total de eritrocitos y el incremento en la cuenta total de leucocitos a diferentes concentraciones se encuentran graficadas en las Figuras 5 y 6. La prueba de Tukey ($p < 0,05$) mostró que los promedios de los parámetros hematológicos para N-amonio a concentraciones de 1,0 y 2,0 mg L⁻¹ fueron significativamente diferentes del valor control.

Consumo de oxígeno

Para los peces climatizados a 20°C el consumo específico de oxígeno disminuyó con el incremento de la concentración de carbofurán. El promedio de consumo específico de oxígeno de la tilapia expuesta a 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg carbofurán L⁻¹ fue 0,063; 0,13; 0,16 y 0,23 mL oxígeno g⁻¹ min⁻¹, respectivamente (Figura 7).

Estos valores representan una disminución en el nivel metabólico de 42,7 y un incremento de 18,18; 45,45 y 110%, en relación al nivel control. Utilizando la prueba estadística de Tukey ($P < 0,05$)

se verificó que el consumo promedio de oxígeno a concentraciones de carbofurán de 1,0 y 2,0 mg L⁻¹ fue significativamente diferente del control (0,0 mg L⁻¹). Se observó una diferencia significativa en el consumo de oxígeno entre las soluciones de carbofurán a 0,5 mg L⁻¹ y a 2,0 mg L⁻¹.

Excreción de amonio

Después de exposiciones de 1 h, los niveles promedio de amonio excretado por las tilapias expuestas a 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 mg carbofurán L⁻¹ fueron

de 0,009; 0,013; 0,030 y 0,033 mg L⁻¹. Estos valores representan una disminución metabólica de 67,87% y 53,57%, y un incremento de 7,14 y 17,85%, en relación al control (Figura 8).

Utilizando la prueba estadística de Tukey (P<0,05), se encontró que la excreción promedio de amonio a una concentración de 1,0 y 2,0 mg L⁻¹ de carbofurán no fue significativamente diferente a la del control (0,0 mg L⁻¹). Similarmente los promedios de la excreción de amonio a 0,1 mg L⁻¹ de carbofurán, fueron significativamente diferentes a los de 1,0 y 2,0 mg L⁻¹.

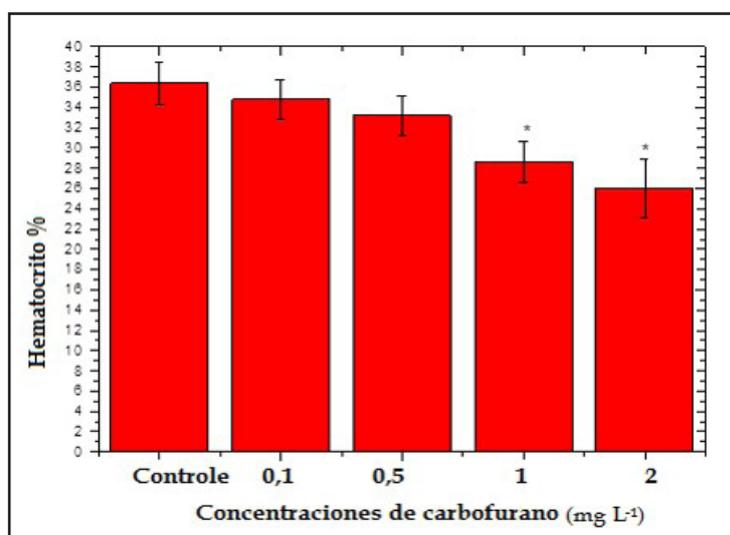


Figura 2. Variación de hematocrito a diferentes concentraciones de carbofurán en *O. niloticus*. Las barras corresponden a las desviaciones estándar respectivas (n = 5). *Diferencias significativas (p < 0,05). No obstante, la hemoglobina total disminuyó con el aumento de la concentración de carbofurán (Figura 3) y la glucosa en la sangre se incrementó con la concentración de carbofurán (Figura 4).

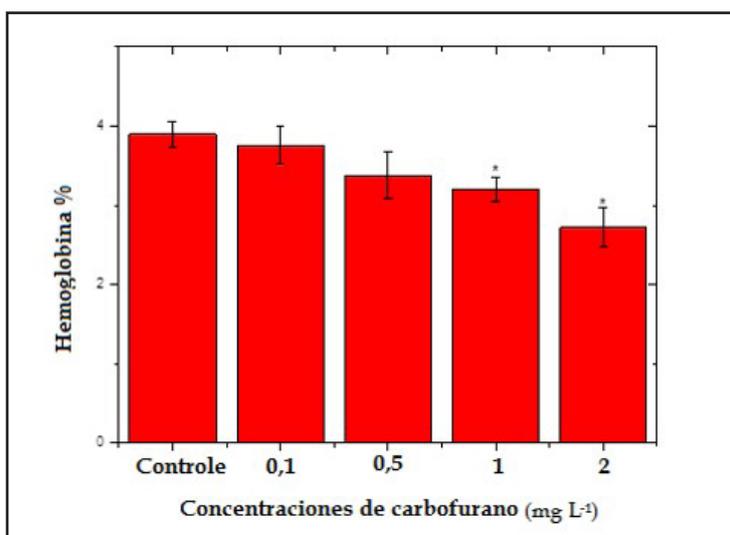


Figura 3. Variación de hemoglobina total a diferentes concentraciones de carbofurán en *O. niloticus*. Las barras corresponden a las desviaciones estándar respectivas (n = 5). *Diferencias significativas (p < 0,05).

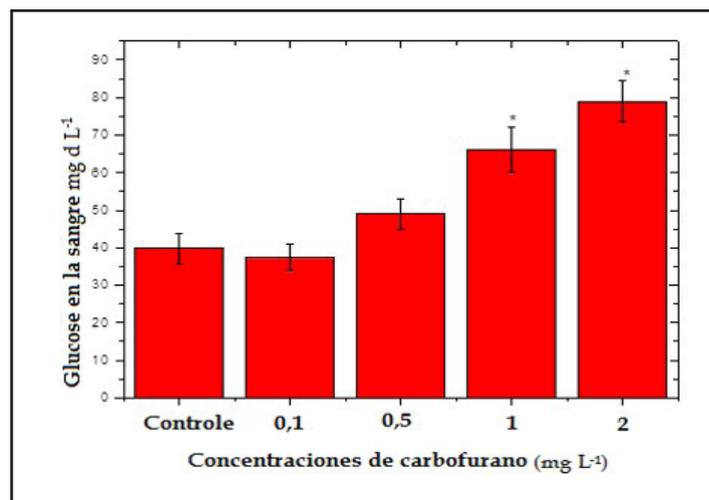


Figura 4. Variación de la glucosa en la sangre a diferentes concentraciones de carbofurán en *O. niloticus*. Las barras corresponden a las desviaciones estándar respectivas (n = 5). *Diferencias significativas (p < 0,05).

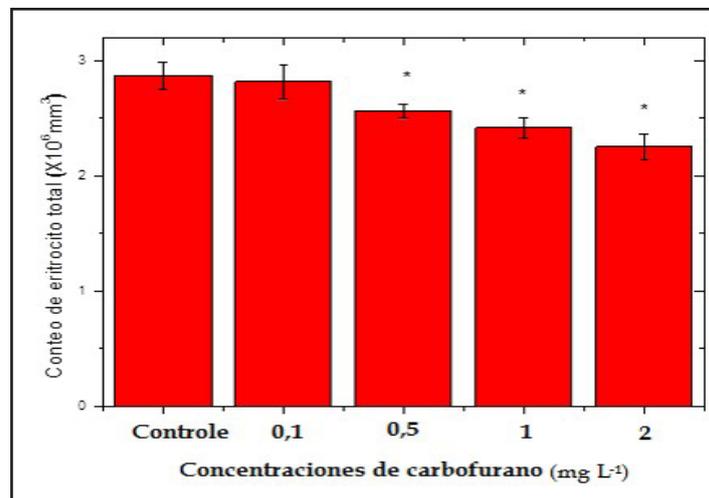


Figura 5. Variación en el conteo de eritrocito total a diferentes concentraciones de carbofurán en *O. niloticus*. Las barras corresponden a las desviaciones estándar respectivas (n = 5). *Diferencias significativas (p < 0,05).

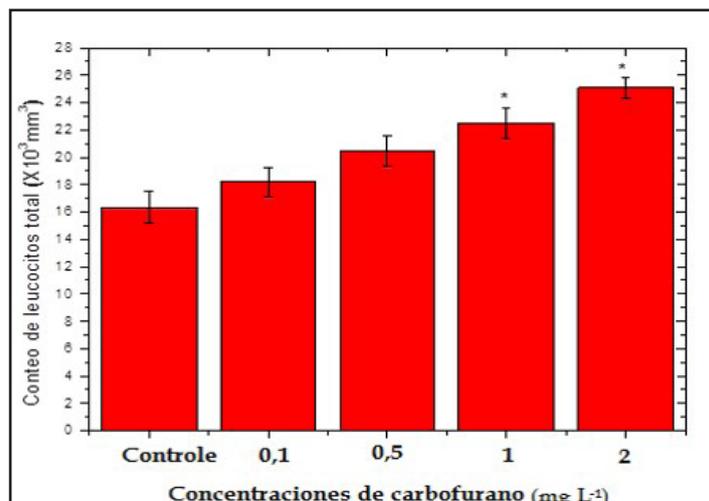


Figura 6. Variación en el conteo de leucocitos totales a diferentes concentraciones de carbofurán en *O. niloticus*. Las barras corresponden a las desviaciones estándar respectivas (n = 5). *Diferencias significativas (p < 0,05).

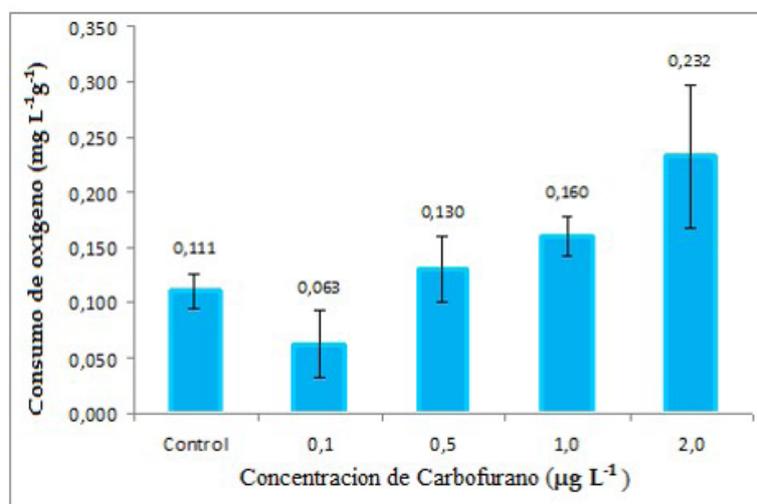


Figura 7. Variación en el consumo de oxígeno específico en *O. niloticus* a diferentes concentraciones de carbofurán. Las barras corresponden a las desviaciones estándar ($n = 5$).

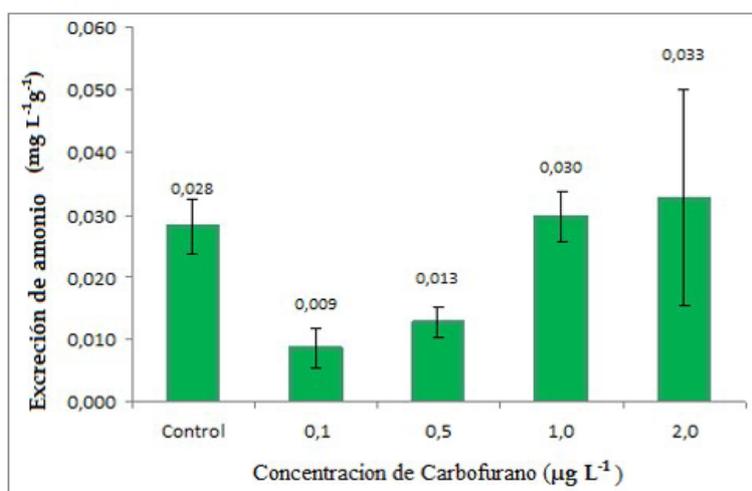


Figura 8. Variación en la excreción de amonio específica a diferentes concentraciones de carbofurán. Las barras corresponden a las desviaciones estándar específicas ($n = 5$).

DISCUSIÓN

Los efectos tóxicos de carbofurán en varias especies de peces y crustáceos han sido estudiados por diferentes autores (ARTHUR *et al.*, 1987; TWITCHEN, 1994; RANDALL y TSUI, 2002; MORAES y POLEZ, 2004; KARASU y KÖKSAL, 2005; CAMPOS-GARCIA *et al.*, 2015; BARBIERI *et al.*, 2016). Los resultados del presente estudio confirman que el carbofurán es tóxico para los juveniles de *O. niloticus*.

Los efectos tóxicos del carbofurán en varios organismos han sido reportados (WICKS y RANDALL, 2002), para diferentes niveles tóxicos de carbofurán en *Oncorhynchus mykiss* (TWITCHEN,

1994), *Oreochromis niloticus* (MARTINEZ *et al.*, 2013), *Labeo rohita* (ADHIKARI *et al.*, 2004), *Cyprinus carpio* (SVOBODA *et al.*, 2001), *Oncorhynchus kisutch* (PERSON-LE *et al.*, 1998). En este estudio la LC50 de carbofurán (96 h) estuvo en el rango de 1,92 a 2,45 mg L^{-1} para *O. niloticus*. Las LC50 para otras especies fueron: 0,8 – 0,9 mg L^{-1} (*Trucha arcoiris*) y 0,8 mg L^{-1} (*C. carpio*) (EPA, 2002). Los juveniles de *O. niloticus* pueden considerarse más tolerantes al compararse con esas especies.

Los cambios de temperatura tienen efectos considerables sobre algunos procesos fisiológicos, principalmente acelerando la mayoría de ellos. En general, una elevación de 10°C en la temperatura causa un incremento de dos a tres veces en la tasa de

consumo de oxígeno (WENDELAAE, 1997). Asociado al aumento de la temperatura, hubo una tendencia en la LC50 a incrementarse. Los efectos del carbofurán sobre *O. niloticus* son mínimos a bajas temperaturas para las concentraciones debajo de 0,2 mg L⁻¹. Sin embargo, a 25°C y a la concentración más alta de carbofurán (4,0 mg L⁻¹), se observó un incremento significativo en la toxicidad. Según FRY (1971) la temperatura es un factor ambiental que puede afectar a los organismos en una forma letal, controlada, directa o indirecta, dependiendo del tiempo y/o la intensidad del estímulo, extensión espacial de influencia y la capacidad del organismo para ajustarse a estudios de variaciones terminales.

Los parámetros sanguíneos reflejan el estado de un organismo, siendo importantes en el diagnóstico de la situación estructural y funcional de los peces expuestos a agentes tóxicos (RATH, 1980). Nuestros resultados sugieren que una exposición de 48 h a bajas concentraciones de carbofurán (0,1–2,0 mg L⁻¹) promueven respuestas hematológicas en *O. niloticus* similares a las observadas en otros peces expuestos a diferentes concentraciones de carbofurán. Los estudios sugieren que esta respuesta probablemente ocurre debido a posibles lesiones en el tejido de las branquias, resultando en hipoxia interna y una disregulación de la eritropoyesis (MISRA, 1985; MORAES, 2004; CAMPOS-GARCIA *et al.*, 2016; MISRA, 1985). Sin embargo, los grupos de peces expuestos a altas concentraciones de carbofurán mostraron una disminución significativa de hematocrito, lo cual indica pérdida de capacidad para mantener la homeostasis, probablemente debido a agotamiento y el daño del tejido hematopoyético.

La exposición de *O. niloticus* a niveles subletales de carbofurán resultó en un descenso significativo del conteo de eritrocito total y un incremento en el conteo de leucocito total. La disminución en el conteo de hematocrito y eritrocito, sugiere que el pez comenzó a sufrir anemia a causa de la exposición al carbofurán (BARBIERI y BONDIOLI, 2013). Esta respuesta también fue registrada en *L. rohita* como un efecto agudo del carbofurán (ADHIKARI *et al.*, 2004) y diazinón (SVOBODA *et al.*, 2001). La anemia en los peces a causa de la exposición a carbofurán podría deberse a la inhibición de la eritropoyesis y hemosíntesis y a un incremento en la tasa de destrucción de eritrocitos en órganos hemopoyéticos (ADHIKARI *et al.*, 2004).

La hiperglucemia presentada por *O. niloticus* está asociada probablemente con la movilización de

sustratos de energía generada como una respuesta al estrés, indicando que altas concentraciones de carbofurán son estresantes para el pez. Este fenómeno también ha sido observado en *Cirrhinus mrigala*, el cual presentó un incremento progresivo de glucemia relacionado con el incremento en las concentraciones de amonio en agua. Las altas concentraciones de carbofurán también promovieron una situación de estrés para *Clarias batrachus*, al observarse trastornos en el metabolismo de proteínas y carbohidratos en el tejido hepático y muscular (BEGUM, 2004). La respuesta endocrina a la hiperglucemia, que resulta en movilización rápida de reservas de energía, puede considerarse como un mecanismo adaptativo que permite al cuerpo un incremento en la demanda de energía durante la exposición a agentes de estrés (SARAVANA y GERALDINE, 2001).

La exposición a un insecticida causó la disminución en la captación de oxígeno en las branquias, cerebro y tejidos musculares de tilapia (*Tilapia mossambic*) después de una exposición de 15 días a 0,5 mg L⁻¹. Los presentes experimentos también demostraron que el consumo de oxígeno por *O. niloticus* no presentó relación lineal con los niveles de oxígeno ambiental, independientemente de si los peces fueron expuestos a carbofurán.

A pesar de su capacidad regulatoria, la tasa de consumo de oxígeno se incrementó 2,0 mg L⁻¹ con la concentración de carbofurán para *O. niloticus* (Figura 6). Resultados similares han sido observados en diferentes especies de peces para otros compuestos químicos (SILVA *et al.*, 1993). El incremento significativo en el consumo de oxígeno es probablemente el resultado de alteraciones en el metabolismo energético (CHRISTIANSEN *et al.*, 1998; BOSISIO *et al.*, 2017). Algunos estudios de los efectos patológicos de la exposición crónica a compuestos químicos han reportado la destrucción gradual de los filamentos de las branquias, con muerte de los peces por asfixia (BARBIERI, 2007). Esto es lo que probablemente ocurrió en este estudio con los especímenes de *O. niloticus* expuestos a 4,0 mg L⁻¹ de carbofurán, los cuales murieron en menos de 1 h. El punto final del consumo de oxígeno también proporciona un índice del estrés subletal y es útil para el biomonitoreo de los efectos potencialmente tóxicos de compuestos químicos (BARBIERI *et al.*, 2016).

En el presente proyecto se observó una disminución de la excreción de amonio de 67,87% y 53,57% en las menores concentraciones ensayadas, y un aumento de 7,14 y 17,85% en las mayores

concentraciones ensayadas, en relación al control. El amonio es uno de los productos finales del catabolismo, principalmente de aminoácidos que podrían tener un origen alimentario o muscular, dependiendo de las condiciones nutricionales (MAYZAUD y CONOVER, 1988). Además de ser utilizados como sustratos de energía y componentes estructurales del organismo, los aminoácidos pueden ser más importantes que los iones en el mantenimiento de la presión osmótica en langostinos tales como *P. setiferus* (ROSAS *et al.*, 1999; BARBIERI *et al.*, 2013). Típicamente, los incrementos en la excreción de amonio reflejan un incremento en el catabolismo de aminoácidos. Sin embargo, cuando los organismos son expuestos a concentraciones letales de carbofurán, se observa disfunción en el control de la excreción de amonio que sigue al daño de las branquias. Esto probablemente indica que existe una pérdida inicial en el balance osmótico en las células. La posterior regresión de las arrugas podría significar que el epitelio todavía es capaz de ajustarse después de una agresión inicial. El nitrógeno excretado por los peces sugiere una reducción del catabolismo de aminoácidos libres y/o además un incremento en la síntesis de polipéptidos. Otra explicación podría ser el efecto tóxico sobre el epitelio de las branquias, causando un cambio en la excreción de nitrógeno. La secreción de mucosidad en la cámara de la branquia podría ser provocada por la exposición a carbofurán como se observó en el langostino de agua dulce *Macrobrachium malcolmsonii* (BARBIERI *et al.*, 2016). Estudios posteriores realizados por MACHADO y FANTA (2003) demostraron que ocurren cambios patológicos en el tejido branquial del pez de agua dulce *Metynnis roosevelti* expuesto a metilparatión por 8 h. El efecto del metilparatión en el epitelio branquial de *M. roosevelti* fue muy drástico, incluyendo cambios estructurales en la organización de las lamelas de la agalla, separación epitelial, necrosis, hiperplasia, pérdida de micronervaduras y morfología celular alterada.

CONCLUSIONES

Los presentes resultados permiten la comparación de la sensibilidad al carbofurán entre *O. niloticus* y diferentes especies tratadas experimentalmente en una forma similar **en otros estudios**. La hipótesis de este estudio fue confirmada, ya que un incremento en la concentración de carbofurán promovió cambios en la mortalidad, parámetros hematológicos, consumo

de oxígeno y en la excreción de amonio **de juveniles de *O. niloticus***, conforme la concentración del plaguicida se incrementaba.

Es importante subrayar que la exposición al carbofurán, especialmente en altas temperaturas es un factor significativo a ser considerado en el manejo de la acuicultura.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a FAPESP (Processo 2012/50184-8) y CNPq (Processo 303920/2013-0-Bolsa Produtividade) por su apoyo en la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- ADAMS, S.M. 1990 Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *American Fisheries Society Symposium Series*, 8(1): 1-8.
- ADHIKARI, S.; SARKAR, B.; CHATTERJE, E.A.; MAHAPATRA, C.T.; AYYAPPAN, S. 2004 Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(2): 220-226.
- AGUIAR, L.H.; MORAES, G.; AVILEZ, I.M.; ALTRAN, A.E.; CORRÊA, C.F. 2004 Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã *Brycon cephalus*. *Environmental Research*, 95(2): 224-230.
- ARTHUR, J.W.; CORLIS, W.W.; ALLEN, K.N.; HEDTKE, S.F. 1987 Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 38(3): 324-331.
- ARRUDA, L.F. 2004 *Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo Oreochromis niloticus para obtenção de silagem e óleo como subprodutos*. São Paulo. 230f. (Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ).
- BARBIERI, E. 2007 The use of active metabolism

- and swimming activity to evaluate the toxicity of dodecyl benzene sodium sulfonate (LAS-C12) on the *Mugil platanus* (Mullet) according to temperature and salinity. *Water Environment Research*, 79(7): 707-719.
- BARBIERI, E. 2009 Effect of 2, 4-D herbicide (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae). *Ecotoxicology*, 18(1): 55-60.
- BARBIERI, E.; BRANCO, J. O.; FERRÃO, M.C.; HIDALGO, K. R. 2013 Effects of Cadmium and Zinc on Oxygen consumption and ammonia excretion of the Sea-bob-shrimp, according to temperature. *Boletim do Instituto de Pesca*, 39(3): 299-309.
- BARBIERI, E.; MOREIRA, P.; LUCHINI, L.A.; HIDALGO, K.R.; MUNOZ, A. 2016 Assessment of acute toxicity of carbofuran in *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) at different temperature levels. *Toxicology and Industrial Health*, 32(1): 7-14.
- BARBIERI, E.; BONDIOLI, A.C.V. 2013 Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. *Aquaculture Research*, 44(5): 543-551.
- BEGUM, G. 2004 Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn) and recovery response. *Aquatic Toxicology*, 66(1): 83-92.
- BOSISIO, F.; REZENDE, K.F.O.; BARBIERI, E. 2017 Alterations in the hematological parameters of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) submitted to different salinities. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 12(2):146-154.
- BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. 1989 *Fish as "biological model" for experimental studies in ecotoxicology*. In: BOUDOU, A. y RIBEYRE, F. (eds) *Aquatic ecotoxicology fundamental concepts and methodologies*. CRC Press, Boca Raton, 127-150pp.
- BRETAUD, S.; TOUTANT, J.P.; SAGLIO, P. 2000 Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2): 117-124.
- CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D.S.T.; REZENDE, K.F.O.; SILVA, J.R.M.C.; ALVES, O.L., BARBIERI, E. 2016 Histopathological alterations in the gills of Nile tilapia exposed to carbofuran and multiwalled carbon nanotubes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 481-488.
- CAMPOS-GARCIA, J.C.; MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2015 Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111: 131-137.
- CARR, L.R.; CHAMBERS, J.E. 1996 Kinetic analysis of in vitro inhibition, aging, and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel cat fish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 139(3): 365-373.
- CHRISTIANSEN, P.D.; BROZEK, K.; HANSEN, B.W. 1998 Energetic and behavioral responses by the common goby, *Pomatoschistus microps* (Kroyer), exposed to linear alkybenzene sulfonate. *Environmental Toxicology Chemistry*, 17(10): 2051-2057.
- COA, F.; MEDEIROS, A.M.Z.; BARBIERI, E. 2017 Record of Nile tilapia in the Mandira River, Cananéia, São Paulo State. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43(1): 87-91.
- DAMATO, M.; BARBIERI, E. 2012 Estudo da toxicidade aguda e alterações metabólicas provocadas pela exposição do cádmio sobre o peixe *Hyphessobrycon callistus* utilizado como indicador de saúde ambiental. *Mundo Saúde*, 36(4), 574-81.

- DRABKIN, D. 1949 The standardization of hemoglobin measurement. *The American Journal of the Medical Sciences*, 217(5): 710-711.
- EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY 2002 *Public Health Goal for Carbofuran in drink water*. Office of Environmental health Hazard Assessment. Washington.
- FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARÍA, F.M.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. 2004 Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. *Acta Scientiarum*, 26(3): 345-352.
- FRY, F.E.J. 1971 The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. (Eds.) *Fish Physiology*. Academic Press, New York, 98p.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environmental Science & Technology*, 11(7): 714-719.
- HANSEN, B.; FOTEL, R.L.; JESEN, N.J.; WITTRUP, L. 1997 Physiological effects of the detergent linear alkylbenzene sulphonate on blue mussel larvae *Mytilus edulis* in laboratory and mesocosm experiments. *Marine Biology*, 128(6): 627-637.
- HERNÁNDEZ-MORENO, D.; PÉREZ-LÓPEZ, M.; SOLER, F.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. 2011 Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Study of biomarkers and behaviour alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(10): 1905-1912.
- JASH, N.B.; BHATTACHARAYA, S. 1983 Delayed toxicity of carbofuran in fresh water teleost *Channa punctatus*. *Indian Journal Experimental Biology*, 17(6): 693-697.
- JYOTHI, B.; NARAYAN, G. 1999 Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). *Food Chemistry and Toxicology*, 37(4): 417-421.
- KARASU-BENLI, A.C.; KÖKSAL, G. 2005 The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(3): 339-344.
- LEMAIRE, P.; STURVE, J.; FORLIN, L.; LIVINGSTONE, D.R. 1996 Studies on aromatic hydrocarbon quinone metabolism and DT-diaphorase function in liver of fish species. *Marine Environmental Research*, 2(1-4): 317-321.
- MACHADO, M.R.; FANTA, E. 2003 Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Brazilian Archive of. Biology and Technology*, 46(3): 361-372.
- MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2013 *Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish*. In: Journal of Physics. Conference Series, IOP Publishing, 12043p.
- MAYZAUD, P.; CONOVER, R.J. 1988 O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine Ecology Progress Serie*, 45(3): 289-302.
- MISRA, V.; LAL, H.; CHAWLA, G.; VISWANATHAN, P.N. 1985 Pathomorphological changes in gills of fish fingerlings (*Cirrhina mrigala*) by linear alkyl benzene sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 10(3): 302-308.
- MORAES, G.; POLEZ, V.L.; IWAMA, G.K. 2004 Biochemical responses of two Erythrinidae fish to environmental ammonia. *Brazilian Journal of Biology*, 64(1): 95-102.
- PATHIRATNE, A.; GEORGE, S.G. 1998 Toxicity of malathion to Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. *Aquatic Toxicology*, 43(2): 261-271.
- PERSON, L.E.; RUYET, J.; BOEUF, G.;

- ZAMBONINO, J.I.; HELGASON, S.L.E.; ROUX, A. 1998 Short-term physiological changes in turbot and seabream juveniles exposed to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119(2): 511-518.
- RANDALL, D.J.; TSUI, T.K.N. 2002 Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1): 17-23.
- RANZANI - PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES - DIAS, M.; EGAMI, M.I. *Métodos para análise hematologia de peixes*. 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2013. 142p
- RATH, S; MISRA, B.N. 1980 Age-related changes in oxygen consumption by gill, brain and muscle tissues of *Tilapia mossambica* Peters exposed to Dichlorvos (DDVP). *Environmental Pollution (Ser A)*, 23(1): 95-101.
- ROSAS, C.; MARTINEZ, E.; GAXIOLA, G.; BRITO, R.; SANCHEZ, A.; SOTO, L.A. 1999 The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion, and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* Juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 234(1): 41-57.
- SANTOS, D.B.; BARBIERI, E; BONDIOLI, A.C. ; MELO, C.B. 2014 Effects of Lead in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) metabolism regarding salinity. *O Mundo da Saúde*, 38(1): 16-23.
- SARAVANA, P.B.; GERALDINE, P. 2001 Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 70(1): 27-41.
- SCHRECK, C.B. 1990 Physiological, Behavioral and performance indicators of stress. *American Fisheries Society Symposium Series*, 8(1): 29-37.
- SILVA, H.C.; MEDINA, H.S.G.; FANTA, E.; BACILA, M. 1993 Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 Methyl Parathion on *Callichthys callichthys* (Pisces, Teleostei). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105 C(2): 197-201.
- SOLORZANO, L. 1969 Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. Paraíba. (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual da Paraíba).
- STRAUSS, D.L.; CHAMBERS, J.E. 1995 Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterase of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion and S, S, S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). *Aquatic Toxicology*, 33(2): 311-324.
- SUKUMAR, A.; KARPAGAGANAPATHY, P.R. 1992 Pesticide-induced atresia in ovary of a fresh water fish, *Colisa lalia* (Hamilton-Buchanan). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3): 457-462.
- SVOBODA, M.; LUSKOVA, V.; DRASTICHOVA, J.; ILABEK, V. 2001 The effect of diazinon on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria (Brno)*, 70(4): 457-465.
- TWITCHEN, I.D.; EDDY, F.B. 1994 Sublethal effects of ammonia on freshwater fish. In: MÜLLER, R; LLOYD, R. (Eds.) *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Blackwell Scientific Publications, Fishing News Books, Londres, UK.
- WARING, C.P.; MOORE, A. 1997 Sublethal effects of a carbamate pesticide on pheromonal mediated endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(2): 203-211.
- WENDELAAR, B.S. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 591-625.
- WICKS, B.J; RANDALL, D.J. 2002 The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132(2): 275-285.
- WINKLER, L. 1888 *Methods for measurement of dissolved oxygen*. Ber Deutsch Chem Ges 21,

2843p.

WINTROBE, M.M. 1978 *Clinical Hematology*.
Kipton, London.p132

WU, J.P.; CHEN, H.C. 2004 Effects of cadmium
and zinc on oxygen consumption, ammonium
excretion, and osmoregulation of white
shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*,
57(11): 1591- 1598.