

AMARA MANARINO ANDRADE GOULART

**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO DIMILIN[®] EM MACHOS ADULTOS DE
Hyphessobrycon eques (Steindachner, 1882) (TELEOSTEI: CHARACIDAE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA,
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G694e
2012

Goulart, Amara Manarino Andrade, 1979-
Efeitos toxicológicos Dimilin® em machos adultos de
Hyphessobrycon eques (Steindachner, 1882)
(Teleostei : Characidae) / Amara Manarino Andrade. – Viçosa,
MG, 2012.
xiii, 50f. : il. ; 29cm.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 44-50

1. *Hyphessobrycon eques*. 2. Diflubenzuron. 3. Testículos -
Morfologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

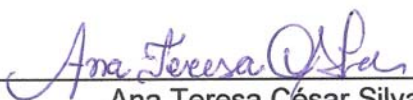
CDD 22. ed. 597.48

AMARA MANARINO ANDRADE GOULART

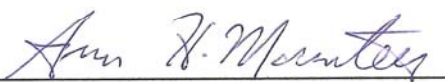
**EFEITOS TOXICOLÓGICOS DO DIMILIN® EM MACHOS ADULTOS
DE *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882)(TELEOSTEI:
CHARACIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de setembro de 2012.


Ana Teresa César Silva


Marlene Isabel Vargas Vitoria


Ann Honor Mounteer
(Coorientadora)


Eduardo Paulino da Costa
(Coorientador)


Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei...

(Almir Sater)

Dedico este trabalho aos meus pais por tudo o que me ensinaram, por todo o amor que tenho e recebi deles, e pelo exemplo de vida que são para mim.

À minha família que sempre respeitou as minhas decisões e compreendeu minha ausência física durante este processo, e que me apoiou incondicionalmente, mesmo quando as decisões tomadas não eram as mais acertadas.

AGRADECIMENTOS

Aos animais que perderam a vida em nome da Ciência.

Àquele que em tão pouco tempo foi pra mim uma escola. Meu orientador Laércio dos Anjos Benjamin, que me ensinou através de seu exemplo que competência, seriedade profissional e firmeza nas tomadas de decisões, combinam perfeitamente com o jeito terno e suave de acolher, saber ouvir, aconselhar, incentivar. Que acreditou no meu potencial para realização desta pesquisa. Por sua disponibilidade para discussões, por sua praticidade em administrar tarefas, paciência em ensinar, pelo respeito que tem a diferentes qualidades que existe dentro de cada pessoa de seu laboratório e com isso motivar cada uma delas a fazer seu melhor. A ele todo o meu respeito, admiração e gratidão, pelo conhecimento compartilhado, pela confiança depositada e por seu tempo dedicado nos primórdios de meus estudos ictiológicos, imprescindível para a realização deste trabalho. Admirável por seu profissionalismo, dedicação à ciência e à formação de pesquisadores.

À minha co-orientadora Profa. Ann Honor Munteer, pelos conhecimentos passados em Ecotoxicologia, e pela colaboração neste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Eduardo Paulino, pela ajuda e paciência quando tratamos dos dados estatísticos.

Agradeço, acima de tudo, aos meus pais, responsáveis por me dar a oportunidade de morar e estudar fora da minha cidade natal. À minha mãe, a pessoa que não só me deu, como me ensinou a vida. O meu pai, meu maior exemplo, obrigado por tudo! Amo vocês! Apesar da distância física, estiveram presentes em meu coração durante todo esse tempo. Muita coisa se passou, muita ainda está pra vir, mas o que importa é que estaremos sempre juntos para o que der e vier. Principalmente por me darem força para superar os obstáculos e imprevistos da vida, mesmo que grandes, dando coragem para continuar.

A minha querida avó Léa Pimentel Mannarino (*in memoriam*), pelo carinho depositado em minha pessoa, que não pode ver minha matrícula no mestrado, mas que com certeza me acompanhou até o presente momento.

Aos meus irmãos, Tako e Ângelo, por se orgulharem ao ver mais um passo por mim conquistado.

Aos meus sobrinhos, tios, primos e a minha avó Angélica, que muitas vezes não pude compartilhar os momentos bons nas reuniões de nossa família devido à minha falta de tempo.

Aos melhores amigos, irmãos e companheiros de trabalho que uma pessoa pode ter: Paulo Burlamaqui (pelo capricho e cuidado em experimentos como a análise de água e na ajuda final), Giselle Dias (pelas risadas, papos) Lucas Marcon (pela dedicação, paciência e experiência passadas), Polyana Galvão (pelo exemplo de aluna e pesquisadora que um dia quero alcançar), Leandro Nunes (pelas dicas de como lidar com Mato Grosso), Fausto Ferraz (pelas macaquices), Samilla e Mariana (recém-chegadas). Pelas grandes conversas. Pelos agradáveis almoços de domingo e por todas as confraternizações em geral e descontração na hora do café. Graças a vocês eu sei o que é ter saudades do trabalho.

À dupla dinâmica Diego Senra e Mila Vasques, por me ajudarem em praticamente todas as fases do meu mestrado: da alegria a agonia. Mas, principalmente, por me ensinarem que é possível não ter apenas colegas de trabalho, e sim AMIGOS de trabalho. Pelas boas lembranças de nossas trajetórias, pelos nossos sacrifícios e superações. Obrigada pela amizade incondicional, carinho, conselhos, brincadeiras, broncas. Obrigada por ouvirem até de madrugada os meus desabafos, pelas horas e horas de bate papo na internet, e, principalmente, por me ensinarem o verdadeiro sentido da palavra amigo. MERMÃOS FOREVER...S2

A todos vocês agradeço, também, por toda ajuda em coletas, por estarmos juntos neste projeto e dividirmos momentos de estresse do trabalho em que nada dava certo, que prontamente providenciaram todos os meios para a realização deste trabalho. Saibam que eu não conseguiria sem vocês.

À minha amiga Sanely Costa, este anjo iluminado, que foi fundamental durante todo o meu processo. Pela sua boa energia, seus conselhos, pela forma como simplifica os problemas. Você é uma pessoa maravilhosa que merece o melhor da vida.

Ao Odilon Calian, pela enorme amizade e por me auxiliar nos momentos de

dificuldade, desde o ingresso do mestrado.

À Andrea Goulart, pelas longas conversas nas viagens de Muriaé para Viçosa, grande colega e amiga.

A toda galera do mestrado, em especial: Rafaella, Wendeo, Paulo Victor, Vinicius, Fernely, Fernanda, Luciana, Isafas, Edil, Lidiane pelos grupos de trabalho, dias de estudo, e a todos que de alguma maneira contribuíram durante essa caminhada.

A todos os meus bons e grandes amigos, aqui sem citar nomes, por acreditarem que eu era capaz.

Aos membros da Banca Examinadora, pelos comentários pertinentes e valiosas sugestões e críticas, contribuindo sobremaneira para a melhora deste trabalho.

À minha ex-professora, e hoje amiga, Ana Teresa, por ter plantado em mim a ideia de fazer pós-graduação e me fazer acreditar que esse sonho era possível.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Veterinária da UFV, por compartilharem conhecimentos e experiências, pela amizade e apoio.

Ao Luís Eduardo e a todo pessoal do ETA, pelas análises de água realizadas.

A Secretária da pós-graduação Rosi, pelos préstimos servidos, sempre com eficiência, tão solícita em todos os momentos.

A Margô por matar minha fome na correria e pelos papos agradáveis.

À Maria do Carmo Fontes, pelo carinho em todos os momentos, e a sua irmã Maria Fontes por terem me acolhido em sua casa.

As meninas da república, pela ajuda nos momentos finais da minha dissertação.

A todos aqueles que de alguma forma participaram de minha formação, com maior ou menor intensidade, e sempre me incentivaram na minha Carreira Universitária, aqui omitidos, porém não esquecidos.

Enfim, agradeço por tudo e a todos pelo que aprendi nesta etapa da minha vida, início de carreira, que foi na verdade a realização de um sonho.

Mais uma vez, muito obrigada!

BIOGRAFIA

Amara Manarino Andrade Goulart, filha de Newton Eustáquio Andrade Goulart e Regina Manarino Goulart, nasceu na cidade de Muriaé, Minas Gerais, em 3 de setembro de 1979.

Em dezembro de 1994 concluiu o Ensino Fundamental pelo Colégio Santa Marcelina, em Muriaé-MG.

Em dezembro de 1997 concluiu o Ensino Médio pela E. E. Prof. Orlando Lima Faria, em Muriaé-MG.

Em fevereiro de 2000 iniciou os estudos no Ensino Técnico em Agropecuária no Centro Interescolar de Agropecuária de Itaperuna-RJ, concluindo o mesmo em dezembro de 2001.

Sua carreira acadêmica teve início em 2005 quando ingressou na graduação em Ciências Biológicas, pela FAFISM (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras “Santa Marcelina”), colando grau em 2008.

No ano de 2007 participou no Programa de Iniciação Científica da FAFISM (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras “Santa Marcelina”), Muriaé-MG.

Em agosto de 2010, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, MG, sob a orientação do professor Laércio dos Anjos Benjamin, com área de concentração em Morfofisiologia de Animais Domésticos e Silvestres, defendendo a dissertação em setembro de 2012.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Ecotoxicologia	2
2.2 Avaliação ecotoxicológica	4
2.3 Efeitos da exposição a agrotóxicos	8
2.4 Uso de agrotóxicos na aquicultura com fins terapêuticos	9
2.5 O inseticida diflubenzuron	10
2.6 O peixe mato grosso <i>Hyphessobrycon eques</i> (Steindachner, 1882)	15
2.7 Anatomia testicular de teleósteos	17
2.7.1 Anatomia testicular do <i>H. eques</i>	17
2.7.2 Características histológicas testiculares do <i>H. eques</i>	18
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Normas de conduta para o uso de animais na pesquisa	21
4. 2 Animais	21
4.3 Produto químico	22
4.4 Análise de água	22
4.5 Ensaios toxicológicos	22
4.5.1 Diluição do inseticida Dimilin® na água	22
4.5.2 Determinação da CL ₅₀ -96h do Dimilin® para <i>H. eques</i>	23
4.5.3 Testes de toxicidade de 96h e 17 dias	23
4.5.4 Coleta de amostras e processamento para estudo histológico	24
4.5.5 Análise histológica	25
4.6 Análise estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Determinação da CL ₅₀ -96h do Dimilin® para <i>H. eques</i>	28
5.2 Análise de água	30
5.3 Dados biométricos	32

5.4 Análises morfométricas	33
5.5 Análises histopatológicas	37
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

GOULART, Amara Manarino Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2012. **Efeitos toxicológicos do Dimilin® em machos adultos de *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae).** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadores: Ann Honor Mounteere Eduardo Paulino da Costa.

O manejo incorreto de agrotóxicos e a contaminação do ambiente aquático causam lesões em peixes. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos como biomarcadores apresentam bons resultados na avaliação das lesões de contaminação ambiental sobre esses animais. O Dimilin®, proposta deste estudo, é utilizado no controle de ectoparasitos de peixes e, devido à carência de dados das suas lesões em peixes neotropicais, objetiva-se determinar a CL_{50} do Dimilin® para machos adultos sexualmente maduros de mato grosso (*Hyphessobrycon eques*), bem como seu efeito na morfologia testicular em ensaios de toxicidade nos tempos de 96h e 17 dias em sistema estático. O cálculo da CL_{50} foi realizado no programa TOXCALC (USEPA, versão 1.5), com o cálculo de determinação binomial reduzindo o intervalo de confiança por média móvel ($P < 0,05$). Os testes de toxicidade seguiram as normas técnicas de testes em sistema estático da ABNT. Para os testes de toxicidade, foram utilizados um grupo controle e três grupos com concentrações de 0,01; 0,1 e 1 $mg.L^{-1}$ de Dimilin®. Para o teste de 96h foi utilizada uma única aplicação no início do experimento; para o teste de 17 dias foram utilizadas duas aplicações (no início e com 72h após a primeira aplicação). Amostras de água dos aquários foram coletadas para análises físicoquímicas. Após os períodos experimentais, testículos de 10 animais de cada grupo foram coletados e processados para estudo histológico de rotina. Foram observados 10 campos por animal considerando-se aspectos morfométricos e histopatológicos. A CL_{50} calculada nesse teste foi de 22,4 $mg.L^{-1}$, e o intervalo de confiança obtido pela média móvel foi de 13,9 a 34,8 $mg.L^{-1}$ ($P < 0,05$) a uma temperatura média de 22,4°C. A análise da água mostrou que os parâmetros encontravam-se dentro de valores desejáveis para a criação de peixes. Dentre todos os parâmetros testiculares avaliados, houve redução apenas no número de espermatogônias B nos dois experimentos, não havendo diferenças entre

os experimentos. No experimento de 17 dias foram observadas diferenças para tecido alterado e tecido sadio dos grupos controle quando comparados com as demais concentrações ($p < 0,05$), não havendo diferenças para o experimento de 96h, nem entre 17 dias e 96h. Foram observadas picnose nuclear, desorganização tecidual caracterizada pela presença de espermatídes no parênquima testicular e presença de espermatócitos na luz do túbulo, presença de hemácias fora dos capilares sanguíneos, presença de vacúolos no citoplasma de espermatogônias e de espermatócitos e fibrose. Assim, *H. eques* pode ser utilizado como bioindicador e seus testículos como biomarcadores de poluição aquática pelo Dimilin®.

ABSTRACT

GOULART, Amara Manarino Andrade, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa Federal 2012. **Toxicological effects of Dimilin® in adult males of *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae.** Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisers: Ann Honor Munteer and Eduardo Paulino da Costa

The mishandling of pesticides leads to aquatic environment contamination causing lesions in fish. Biochemical, physiological and morphological are biomarkers that show good results in the evaluation of the lesions of environmental contamination on these animals. The Dimilin®, purpose of this study, is used to control ectoparasites of fish and due to lack of data from their injuries in neotropical fish, the objective is to determine the effects of LC₅₀ of Dimilin® on sexually mature males from mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) as well as their effect on testicular morphology in toxicity testing in exposure times of 96 hours and 17 days in static system. The calculation of CL₅₀ was conducted in the program TOXCALC (USEPA, version 1.5) with the calculation to determine the binomial confidence by reducing the interval moving average ($P < 0.05$). The toxicity tests followed the ABNT technical tests in static system. For toxicity tests, it was used a control group and three groups with concentrations of 0,01, 0,1 and 1 mg L⁻¹ of Dimilin®. For the 96 hours test, it was used a single application at the beginning of the experiment. For the 17 days test, it was used two applications (in the beginning of the experiment and 72 hours after the first application). Water samples were collected for the aquarium physicochemical analyzes. After the experimental periods, the testicles of 10 animals from each group were collected and processed for routine histological study. We observed 10 samples per animal considering morphometric and histopathological aspects. The CL₅₀ calculated in this test was 22.4 mg.L⁻¹, and the confidence interval obtained by the moving average was 13.9 to 34.8 mg L⁻¹ ($P < 0.05$) at a mean temperature of 22.4 ° C. Analysis of the water showed that the parameters were within the desirable values for fish farming. Among all testicles parameters observed, there was a reduction of B spermatogonia counting in both experiments, with no differences between experiments. In the 17 days experiment, differences were observed for altered tissue and healthy tissue of the control group compared with the

other concentrations ($p < 0.05$), with no differences for the 96 hours experiment or 96 hours and from 17 days. Nuclear pyknosis were observed, tissue disorganization characterized by the presence of spermatids in the testicular parenchyma and presence of spermatocytes in the lumen of the tubule, the presence of red blood cells out of the blood capillaries, the presence of vacuoles in the cytoplasm of spermatogonia and spermatocytes and fibrosis. Thus *H. eques* can be used as bioindicator and his testicles as biomarkers of aquatic pollution by Dimilin®.

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura vem ganhando mais espaço como atividade econômica, e a piscicultura corresponde a 96% da produção aquícola, uma opção promissora de investimentos e produção alternativa de pescado.

Entretanto, o crescimento e o desenvolvimento da piscicultura favorecem a ocorrência de problemas sanitários relacionados ao manejo inadequado e às más condições ambientais, além de fatores ligados ao transporte e à qualidade da água que afetam os peixes, tornando-os susceptíveis a doenças devido à depressão dos mecanismos de defesa orgânica, levando ao surgimento de surtos infecciosos de natureza microbiana ou parasitária.

Atividades aquícolas apresentam riscos ambientais para a saúde dos animais, entre outros, onde parasitas e predadores que atacam os peixes são redutores de produtividade.

Na piscicultura, alguns produtos são utilizados no controle de ectoparasitas e insetos aquáticos, entre eles o diflubenzuron (nome comercial: Dimilin®), inseticida com ação direta na água ou na ração, segundo Maduenho (2007). Esse composto interfere diretamente na biossíntese de quitina, componente do exoesqueleto dos artrópodes (BORGES et al., 2012), classe de animais onde se encontram os principais ectoparasitos de peixes.

O manejo incorreto destes produtos, além da contaminação do ambiente aquático e dos organismos de cultivo, pode causar efeitos subletais nos peixes.

O uso de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos como biomarcadores tem apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos dos xenobióticos sobre os peixes.

Devido à carência de dados sobre os efeitos do Dimilin® para peixes neotropicais, objetivou-se avaliar os possíveis efeitos desse inseticida sobre *Hyphessobrycon eques* de nome comercial mato grosso. O *H. eques* é uma espécie neotropical que se constituiu um bom potencial bioindicador de qualidade ambiental, sensível à ação de contaminantes, pois sofre bioacumulação e responde a agentes mutagênicos em baixas concentrações. O mato grosso, possível bioindicador ambiental, se faz bom instrumento de pesquisa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ecotoxicologia

O interesse humano pelas questões ambientais tem aumentado devido à crescente contaminação, o que estimula o desenvolvimento de uma nova área de estudos, a ecotoxicologia, que se preocupa em estudar os efeitos prejudiciais de substâncias químicas no ambiente.

A Toxicologia como ciência foi criada em meados do século XIX, cujo objeto de estudo é a intoxicação sob todos os aspectos que demandam de estabelecimento quantitativo da relação de dose e consequência observada. Vaz et al. (2004) mostram que o remédio e o veneno podem ter distinção apenas na forma de seu uso.

A Toxicologia tem como objeto fundamental estudar a intoxicação sob todos os aspectos. Por intoxicação entende-se a manifestação (clínica e/ou laboratorial) de efeitos adversos que revelam um estado anormal, patológico ou não, causado pela interação de um agente químico com um organismo (VAZ et al., 2004). Os agentes tóxicos são substâncias químicas capazes de quebrar o equilíbrio orgânico e, segundo Larini, (1993), a toxicidade é uma propriedade potencial que as substâncias químicas possuem, em maior ou menor grau, de causar um estado patológico em consequência de sua introdução e interação com o organismo, de acordo com Vaz et al. (2004).

Como a maior ou menor gravidade de ação depende de fatores relacionados com a substância química (dosagem, tempo de exposição), com o organismo (espécie, idade, condições de saúde), com o ambiente (temperatura, pH, carbono orgânico, alcalinidade entre outros) e onde a ação ocorre (VAZ et al., 2004).

As propriedades físicoquímicas das substâncias determinam a velocidade com que aparecem os efeitos tóxicos e seu grau de severidade. Atingir o sítio de ação depende da via de introdução no organismo, do solvente, da dose/concentração, e da duração e frequência da exposição, como mostram em seus estudos Vaz et al. (2004).

Segundo Vaz et al. (2004), imunotoxicologia é a área de estudo das disfunções causadas ao sistema imunológico como consequência de exposição a substâncias

químicas, biológicas ou físicas presentes no meio ambiente. O sistema imunológico pode ser alterado, mas outras consequências têm sido verificadas nas exposições a agroquímicos que são usados para combater doenças de peixes, pragas da agricultura, sem terem sido convenientemente estudados.

Os estudos de toxicocinética fornecem informações na diferença da absorção, distribuição, biotransformação, no armazenamento e eliminação de substâncias. Considerando ainda características genéticas, sexo, idade, raça ou espécie, Vaz et al. (2004) propõem que sejam utilizados animais com uniformidade de características.

Na década de 1930, nos Estados Unidos e em países soviéticos, surgiu a preocupação com os ambientes aquáticos, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos sobre a qualidade da água, começou a implementação dos primeiros testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos (RAND, 1995).

Na década de 1940 foi recomendado o uso de peixes para avaliar a toxicidade desses despejos líquidos. Com a evolução dos estudos, nas décadas de 1950 e 1960 deu-se maior importância a critérios e padrões que permitiram as disposições desses agentes em níveis compatíveis à preservação dos recursos hídricos (RAND, 1995). Na década de 1970 houve grande desenvolvimento de sistemas adequados para a condução dos testes de toxicidade aguda e crônica, utilizando ovos e larvas de peixes na avaliação da toxicidade de substâncias químicas (RAND, 1995).

O modelo utilizado na avaliação da toxicidade foi baseado nos critérios norte-americanos e soviéticos, que avaliavam apenas o caráter potável da água e não a qualidade da vida na água. No Brasil, a partir de 1976, os estudos de toxicologia aquática começaram a ser desenvolvidos. Com o avanço dos estudos, o aspecto de manutenção da vida aquática começou a ser percebido e utilizado como critério de avaliação da toxicidade das substâncias químicas, estabelecendo-se padrões seguros para o ambiente e para a qualidade da água (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Na década de 1980 foram desenvolvidos ensaios de toxicidade de curta duração com as fases mais sensíveis de alguns organismos, a fim de aumentar a eficiência e minimizar os custos. Métodos utilizando microcrustáceos e peixes de águas continentais e marinhas foram normatizados e são usados mundialmente,

fazendo parte das exigências legais dos órgãos ambientais em vários países (MACEK, 1980).

Atualmente, as análises ambientais se constituem de ensaios ecotoxicológicos. Em nível de organização biológica, as ferramentas de análise são chamadas de indicadores biológicos ou biomarcadores, que possibilitam a correlação da intensidade da exposição com o efeito biológico da substância avaliada (MAGALHÃES e FERRAO FILHO, 2008).

2.2 Avaliação ecotoxicológica

Quando ecossistemas aquáticos estão poluídos com contaminantes orgânicos e inorgânicos, os peixes serão quase que inevitavelmente contaminados. Os possíveis efeitos de contaminantes nos peixes podem ser avaliados por meio da utilização de biomarcadores, que são definidos como as respostas biológicas, assim como os efeitos provocados pelos poluentes e que identificam sinais de danos iniciais nos peixes (MARTINEZ e CÓLUS, 2002).

A avaliação ecotoxicológica requer conhecimento das fontes de emissão, difusão, transformação e destino dos poluentes no ecossistema e, segundo Maduenho (2007) e Maduenho et al. (2008) é importante conhecer os riscos potenciais desses poluentes para a biota, incluindo o homem. Para se avaliar os efeitos adversos de um agente químico no organismo vivo, são utilizados testes padronizados de toxicidade os quais ajudam a prevenir a ocorrência de alterações de alta relevância ecológica nessas populações. As técnicas que evidenciam respostas em níveis subcelulares de organização biológica são consideradas preventivas, sendo os biomarcadores uma das abordagens mais promissoras (VAZ et al., 2004).

Os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: de exposição, de efeito, e susceptibilidade. Biomarcadores de exposição podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo a uma substância em particular, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna. Os biomarcadores de efeito podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde, decorrentes da exposição e absorção das substâncias xenobióticas (AMORIM, 2003). Dessa forma,

a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeito contribui para a definição da relação dose-resposta. Os biomarcadores de susceptibilidade permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos e, de acordo com estudos de Amorim (2003), o monitoramento por exposição é um procedimento que consiste em uma rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com a finalidade de detectar os possíveis riscos à saúde.

Os indicadores biológicos são muito úteis devido a sua especificidade a certos tipos de impacto, já que inúmeras espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente, mas tolerantes a outros, como afirmam Arias et al. (2007).

A natureza do impacto e as consequências para o ambiente podem ser diversas (Tabela 1), o que demonstra alterações gradativas provocadas nos organismos aquáticos pela entrada de poluentes no sistema e exemplifica uma forma progressiva de dano ao habitat aquático (GOMES et al., 2000).

Tabela 1. Padrões de alterações em animais aquáticos, de acordo com a entrada de poluentes na água e com a mudança da qualidade da água em relação ao tempo de exposição gradativa aos poluentes.

Entrada de Poluentes			
Mudança da qualidade da água			
Imediato	Mudanças comportamentais	Efeito no sistema neuroendócrino	Efeito nas membranas epiteliais
Minutos a horas	Respostas bioquímicas		
	Alterações no metabolismo	Fluidos corpóreos e enzimas	
Dias e semanas	Respostas fisiológicas		
	Consumo de oxigênio	Balanço Osmótico	Alimentação e digestão
Dias e meses	Alteração no desempenho fisiológico		
	Crescimento	Reprodução	
Meses e anos	Impactos nas populações		
Anos e décadas	Estrutura e dinâmicas de comunidades	Função e estrutura de ecossistemas	

Modificada por Gomes et al. (2000).

Segundo Kodo Filho (2006), os espécimes de peixes seguem uma relação semelhante à descrita na Tabela 1. Algumas alterações são mais bem demonstradas quando se analisam os tecidos. Os peixes são excelentes ferramentas no monitoramento de ambientes aquáticos, servindo como importantes bioindicadores, pois estão no topo da cadeia trófica. Oliveira-Ribeiro et al. (2000) relatam que estudos de toxicidade utilizando peixes em condições controladas de laboratório permitem, através das alterações e danos nos tecidos, obter informações importantes correspondentes aos efeitos causados na biota de determinado ecossistema em ambiente natural.

A toxicologia aquática permite estabelecer limites de concentrações ou quantidades de substâncias químicas aceitáveis no ambiente aquático e estudar os efeitos tóxicos de substâncias químicas e outros xenobióticos sobre os organismos aquáticos, incluindo letalidade (mortalidade) e efeitos subletais (alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas patológicas, alterações bioquímicas fisiológicas e comportamentais) de acordo com Vaz et al., (2004).

Os critérios de avaliação final da toxicidade aguda nos ensaios ecotoxicológicos são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste. Normalmente, Vaz et al., (2004), observam-se mortalidade para peixes e imobilidade para invertebrados. Esses critérios são utilizados porque são facilmente determinados e têm significado biológico e ecológico para o ambiente (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade podem ser afetados por fatores bióticos e abióticos. Os fatores bióticos estão relacionados ao estágio de vida, tamanho, idade e estado nutricional dos organismos. Organismos jovens são mais sensíveis às substâncias tóxicas que os adultos. Por essa razão, recomenda-se o uso de organismos em estágios iniciais de vida. Além disso, Zagatto e Bertoletti, (2006) afirmam que todos os organismos utilizados em um determinado ensaio devem ter aproximadamente a mesma idade e devem ser provenientes de uma mesma cultura. Os fatores abióticos que podem interferir nos resultados são pH, oxigênio dissolvido, temperatura, amônia, turbidez, cor aparente, condutividade e dureza da água, que devem ser monitorados durante a execução do teste, como sugerem Vaz et al., (2004).

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda são expressos através das concentrações efetivas medianas (CE_{50}) ou concentrações letais medianas (CL_{50}) que são as concentrações da substância química testada, capazes de causar efeito ou mortalidade a 50% da população em estudo, no período de 24 a 96h de exposição (RAND e PETROCELLI, 1985; ABNT, 2006).

Valores acima da CE_{50} ou CL_{50} ameaçam a integridade, sobrevivência da espécie e o equilíbrio e dinâmica do ecossistema. O ensaio toxicológico de um determinado composto químico inicia-se com os testes de avaliação da toxicidade aguda. O objetivo desse teste é calcular a concentração letal média (CL_{50}) do agente na água onde os organismos estão expostos (RAND e PETROCELLI, 1985).

Estudos com diferentes espécies de peixes para a determinação da concentração letal média em 96h (CL_{50}) de DFB indicam que um dos metabólitos do DFB, a 4-cloroanilina, que se encontra na lista de produtos químicos perigosos da Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico de São Paulo (CETESB, 2007), apresenta elevada toxicidade para peixes, sendo maior que a do próprio produto de origem (FISHER e HALL, 1992).

Investigando a toxicidade letal de DFB, Gartenstein et al. (2006) descreveram efeitos de toxicidade do diflubenzuron no desenvolvimento de *Artemia salina* e *Heliocidaris tuberculata* (ouriço do mar) quando analisaram os efeitos potenciais do DFB. Os autores constataram que DFB teve um forte efeito inibitório sobre o desenvolvimento de *A. salina* após 48h de tratamento, com CL_{50} de $0,35\text{mg.L}^{-1}$. O DFB causou anormalidades no crescimento e desenvolvimento, o que foi significativo para larvas de *H. tuberculata* após 72h em 1mg.L^{-1} e 10mg.L^{-1} , respectivamente, com CL_{50} de $2,69\text{mg.L}^{-1}$.

A CL_{50} -96h de DFB, calculada para truta arco-íris, com peso corporal médio de 1,5g, foi de 240mg.L^{-1} , sob condições de pH 7,4 e temperatura de 10°C (FISHER e HALL, 1992). Para o bagre do canal com peso corporal médio de 2,0g, a CL_{50} -96h foi superior a 100mg.L^{-1} em pH de 7,4 e temperatura de 22°C (FISHER e HALL, 1992). Para o *Poecilia reticulata* com quatro semanas de idade, concentrações inferiores a $36\mu\text{g.L}^{-1}$ não causaram qualquer efeito sobre a espécie em condições de pH 7,3 e temperatura de 20°C (NEBEKER et al., 1983).

2.3 Efeitos da exposição a agrotóxicos

As alterações histológicas em tecidos de peixes são biomarcadores de exposição a estressores ambientais e sinalizam os efeitos e/ou respostas resultantes da exposição a um ou mais agentes tóxicos. Essa categoria de biomarcadores tem a vantagem de permitir o exame de órgãos alvo e células específicas em animais expostos a poluentes tanto em condições de laboratório como no campo (HINTON et al., 1992). Para esses mesmos autores, biomarcadores representam um instrumento bastante eficaz para a detecção de efeitos diretos causados por compostos químicos em órgãos alvo. A análise da ocorrência de alterações histológicas em órgãos de peixes que foram expostos a algum tipo de contaminante é um método empregado para se avaliar o efeito do agente tóxico na morfologia desse órgão em estudo (que podem ser ovário, fígado, testículo entre outros).

Draredja-Beldi e Soltani (2001) avaliaram, após exposição, a toxicidade do DFB (diflubenzuron) em larvas da espécie *Gambusia affinis* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). O produto foi aplicado durante 24h, a uma concentração de 78µg/L, para testar o crescimento e desenvolvimento do peixe juvenil (7 dia de idade) durante os 45 dias seguintes ao tratamento.

Os resultados mostraram que o diflubenzuron provocou redução significativa tanto em comprimento quanto em peso dos juvenis, 30 dias após o tratamento, em comparação aos controles. Numa segunda série de experiências, com intenção de avaliar as medições de glutathione (GSH), adultos de *G. affinis* foram expostos continuamente a uma concentração de 78µg/L durante 30 dias. O tratamento resultou em redução significativa no teor de glutathione a partir do 15º dia de tratamento, em comparação com os controles (DRAREDJA-BELDI e SOLTANI, 2001).

Para Peakall (1994) a determinação da letalidade é importante para estimar a concentração e potência de uma substância química e a sensibilidade da espécie alvo. Em seguida, outras respostas que não sejam a mortalidade podem ser observadas quando o animal é exposto a concentrações mais baixas (subletal) que aquelas que causem a morte dos organismos. Essas respostas biológicas podem estar relacionadas à exposição ou ao efeito tóxico de um contaminante ambiental.

2.4 Uso de agrotóxicos na aquicultura com fins terapêuticos

A administração de químicos com fins terapêuticos na aquicultura ocorre por rotas diferentes das normalmente adotadas para animais terrestres.

Para o tratamento das doenças em peixes em sistemas de aquicultura, vários protocolos são utilizados, segundo Fouz et al. (2001), e este pode ser feito interna (com medicamento misturado à ração) ou externamente (com administração de inseticidas na água). O método externo é chamado de banho, pode ser de longa duração em recipiente de tratamento, onde os peixes são expostos ao inseticida até total renovação da água, ou pode ser de curta duração, onde os peixes são mantidos em uma solução tóxica na concentração recomendada por períodos que variam de acordo com o tratamento empregado, de acordo com Fouz et al. (2001).

No Brasil, o sistema mais adotado é o banho de imersão dos peixes em solução terapêutica. Os banhos são restritos a compostos solúveis na água e devem ser administrados em ambiente fechado (tanque), com suprimento de renovação de água interrompido durante o tratamento (MABILIA e SOUZA, 2006).

Pavanelli et al. (2000) relatam que os banhos, ora podem ser ministrados em períodos de curta duração e dentro de tanques ou recipientes pequenos e com volumes definidos, ora podem ser realizados nos próprios tanques de criação, onde a renovação da água é mínima e os peixes ficam submetidos à ação do inseticida por períodos prolongados.

Schalch et al. (2005) atentam para o fato de que em muitos países da Europa não há legislação para o uso de antiparasitários em peixes e outros organismos aquáticos. Isto também se aplica ao Brasil, onde a ausência de informações e formulações próprias para a aquicultura leva ao uso indiscriminado de produtos com formulações específicas para a agropecuária no cultivo de peixes.

Neste contexto, o uso indiscriminado de fármacos na aquicultura para tratamento de enfermidades é uma realidade preocupante (MABILIA e SOUZA, 2006), pois produtos utilizados como quimioterápicos na aquicultura brasileira não são desenvolvidos especificamente para combater as enfermidades aquáticas.

Embora exista semelhança entre os ingredientes ativos, no Brasil, a maioria dos produtos empregados é de uso agrícola e/ou veterinário, sem legislação específica e produtos com registro para essa finalidade (MAXIMIANO et al., 2005).

Em contrapartida, o grande problema da utilização desses produtos químicos tóxicos está relacionado aos possíveis impactos negativos que podem provocar quando atingem, nos ambientes aquáticos, espécies sensíveis e não alvos (MABILIA e SOUZA, 2006).

O ecossistema aquático é constantemente perturbado por poluentes tóxicos das mais variadas fontes. Os lixiviados de áreas agrícolas, os crescentes despejos de esgotos domésticos e industriais, e a liberação dos efluentes das pisciculturas, contribuem significativamente para modificações ambientais, reduzem a diversidade de espécies autóctones e aumentam desordenadamente a densidade de determinadas espécies indesejáveis (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

2.5 O inseticida diflubenzuron

O diflubenzuron (DFB) (cujo produto comercial é Dimilin®) é um inseticida que pertence ao grupo da benzoilfenilureia, de nome químico N-[[[4-clorofenil] amino] carbonil]-2,6-difluorobenzamida ou 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil) ureia. Sua fórmula empírica é $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$. Trata-se de um pó cristalino, branco, sem odor, cuja solubilidade em água é de $0,1\text{mg.L}^{-1}$ em temperatura de 20 a 25°C. Por ser considerado de baixa toxicidade, o Dimilin® pertence à classe toxicológica IV (CHEMTURA, 2006). Pertence a um grupo de inseticidas de nova geração denominados reguladores de crescimento ou IGR (*Insect Growth Regulator*), com ação específica para insetos, segundo Lyra et al (1998).

O DFB vem ganhando espaço como um dos pesticidas de grande eficiência no controle da dengue. Além do uso na agricultura, combatendo pragas como a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) dos cultivos soja e lagarta elasmô ou broca-do-colo (*Elasmopalpus lignosellus*) dos cultivos de milho (PANIZZI, 2006). Estudo feito com larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostos ao diflubenzuron indica a viabilidade do seu uso em função da alta mortalidade provocada (MARTINS e SILVA, 2004).

O DFB interfere no processo da ecdise, impedindo a liberação da cutícula velha que se acumula nos espaços intersegmentares, estrangulando as porções segmentares num processo sucessivo e acumulativo. Também bloqueia a muda e provoca a morte da larva. Este é o mecanismo de ação larvicida do DFB sobre *A.*

aegypti, agindo também no mesêntero, destruindo as células, de acordo com estudos de Borges et al (2012).

Embora seja considerada um produto de baixa toxicidade, de acordo com sua classe toxicológica (CHEMTURA, 2006), seu uso requer cuidado, não manuseando ou aplicando o produto sem os equipamentos de proteção individual recomendados, não devendo ser utilizados aqueles danificados. Outras recomendações são não utilizar equipamentos com vazamentos ou defeitos, não desentupir bicos, orifícios e válvulas com a boca, e não transportar o produto junto com alimentos, medicamentos, animais e pessoas (CHEMTURA, 2006).

Por possuir elevada toxicidade para organismos invertebrados aquáticos sua utilização nos Estados Unidos e em países da Europa é restrita, (USEPA, 1997). No Brasil, o Ministério da Agricultura e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) ainda não estabeleceram nenhum tipo de restrição quanto ao uso deste produto na área agrícola. Torna-se um problema quanto ao seu uso em pisciculturas, já que ainda não existe uma legislação que regule o seu uso.

O DFB tem se mostrado pouco persistente no ambiente, degradando-se rapidamente no solo e na água. Sua meia-vida no solo é de dois a seis dias, e na água, de um a sete dias (CHEMTURA, 2006). Porém, é persistente na superfície das folhas, permanecendo na serrapilheira por cerca de um ano. A persistência do DFB é mais baixa em condições de pH (10) e temperatura (38°C) elevados; a luz solar direta, aparentemente não exerce nenhum efeito nessa persistência (CHEMTURA, 2006). Segundo Maduenho (2007), esses valores simulados dificilmente se aplicam às condições ambientais naturais.

Outro fator importante a ser levado em consideração quanto à persistência do DFB no ambiente é a quantidade de matéria orgânica. Estudos indicam que este componente tem grande importância na adsorção e degradação do diflubenzuron no substrato. Águas com maior quantidade de matéria orgânica retêm melhor o produto (FISHER e HALL, 1992).

A estabilidade do DFB foi estudada em condições laboratoriais em sedimentos marinhos em diferentes temperaturas (4 e 14°C). Nenhuma degradação do DFB ocorreu no sedimento de lama (rica em matéria orgânica) ou no sedimento de areia, durante o período experimental de 204 dias (SELVIK et al., 2002).

O mecanismo de ação tóxica do DFB em peixes ainda foi pouco estudado e os trabalhos encontrados na literatura são insuficientes para uma afirmação definitiva de seus efeitos.

Alguns autores relatam que a enzima glutathione-S-transferase está envolvida no processo de detoxificação do DFB e de outros xenobióticos. A exposição crônica ao inseticida DFB provocou aumento da atividade dessa enzima em peixes, o que pode ter causado possíveis danos ao sistema hepático do animal (DE LA VEJA et al., 1997).

Outros autores acreditam que a exposição crônica ao DFB é capaz de provocar alterações em parâmetros hematológicos de peixes. Mabília et al. (2004) utilizaram em seus estudos as dosagens de DFB de $0,01\text{mg.L}^{-1}$, $0,1\text{mg.L}^{-1}$ e 1mg.L^{-1} em banhos de imersão. Os banhos tiveram a duração de 24 horas numa única aplicação, como ocorre no protocolo adotado por muitos piscicultores na região Sul do país (MABÍLIA e SOUZA, 2006). A dose de $0,01\text{mg.L}^{-1}$ é a recomendada por Post (1987) para o tratamento da lerneose.

Burtle e Morrison (1987) utilizaram uma única aplicação de Dimilin® em tanques de peixe dourado (*Notemigonus crysoleucas*) infestados pelo parasita copépoda *Lernaea cyprinacea*. O produto químico foi aplicado a uma taxa de 10 ou 30 $\mu\text{g/L}$, e comparados com controles não tratados. Os peixes foram periodicamente analisados quanto ao nível de infestação, e o zooplâncton monitorado durante o efeito do medicamento.

O tratamento com o Dimilin® reduziu significativamente a infestação parasitária quatro a oito dias após o tratamento, não observando diferença significativa entre as duas dosagens usadas. A população de zooplâncton diminuiu nas lagoas tratadas com Dimilin® após a aplicação; populações de rotíferos recuperaram-se mais tarde; mas as populações de copépodes nas lagoas tratadas com 30 $\mu\text{g/L}$ permaneceram diminuídas por meses após o tratamento em estudo de Burtle e Morrison (1987).

Luzivotto-Santos et al. (2009) utilizaram em seus estudos concentrações 0,05 a 80 g.m^{-3} de Dimilin® com a finalidade de combater a lerneose, e ressaltaram, ainda, que o diflubenzuron foi o ingrediente ativo mais utilizado na bacia do rio Mogi Guaçu (23 empreendimentos), seguido pelo paration metílico (5) e pelo triclorfon (2).

Apesar de ter sido identificado o uso do Dimilin® em 23 empreendimentos, em apenas nove deles foi possível precisar as concentrações que foram empregadas.

Luzivotto-Santos et al. (2009) destacam o caso de um proprietário que admitiu ter utilizado uma concentração em torno de 70 a 80 g.m⁻³.

Neste caso, deve-se considerar a possibilidade do produtor estar equivocado com relação à concentração que utilizou para combater ectoparasitas, pois este valor está muito próximo das concentrações letais para diversas espécies de peixes (PAN, 2007). Mesmo assim, a hipótese de uso desta substância nesta concentração extremamente elevada não deve ser desconsiderada.

Na região metropolitana de São Paulo, o DFB também é o praguicida mais utilizado no combate aos ectoparasitas de peixes (ESTEVES e ISHIKAWA, 2006).

O DFB é potente regulador de crescimento de artrópodes, pois interfere na síntese de quitina durante a fase de muda de estágios imaturos. Segundo Mabília et al. (2004), o percentual de uso de medicamentos no tratamento de lerneose em pisciculturas no estado do Rio Grande do Sul é muito elevado (33,33% dos produtos empregados), sendo utilizados também as avermectinas (19,04%), produtos organofosforados (9,52%) e outros (38,19%).

O Dimilin[®] é muito usado no tratamento de piolhos em kinguios na proporção de uma colher de sopa para cada 240 litros de água. O medicamento deve permanecer na água por 14 dias e ser repetido novamente por mais 14 dias, não sendo recomendada a troca de água entre tratamentos (ALTIERI, 2006). Depois de completado o tratamento, o medicamento poderá ser retirado com o uso de carvão ativado ou trocas parciais de água (ALTIERI, 2006).

Bouboulis et al. (2004) usaram em seus experimentos DFB diluído em óleo de fígado de bacalhau e misturado a ração comercial com um misturador mecânico. Utilizou-se DFB na concentração de 2000 mg.kg⁻¹ de ração. As concentrações foram preparadas antes da alimentação e fornecidas semanalmente para os peixes. Diflubenzuron foi também eficaz no tratamento de *Salmo salar* infectado por piolhos, na dose de 3mg/kg/dia, durante 14 dias (ERDAL et al., 1997).

O DFB tem sido frequentemente usado em piscicultura com eficácia nas concentrações que variam entre 0,5 a 2 mg.L⁻¹ (FUJIMOTO et al., 1999; KUBITZA et al., 1999; SCHALCH, et al., 2005). Porém, alguns trabalhos ressaltam que essas concentrações podem ser letais para populações zooplancônicas, principalmente aquelas que apresentam exoesqueleto quitinoso, como as de invertebrados de água doce, crustáceos marinhos e estuarinos.

A eficácia do DFB foi avaliada por meio de banhos terapêuticos para o controle de *Dolops carvalhoi* em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) naturalmente infestados. O DFB foi aplicado três vezes na concentração de $2,0\text{mg.L}^{-1}$ na água, na forma de banhos com trinta minutos de duração e intervalo de 24h. Na avaliação parasitológica foi constatada a eficácia de 97,2% do DFB (SCHALCH et al., 2005).

Fujimoto et al. (1999) observaram eficácia de 100% do Dimilin® no controle de crustáceos ectoparasitas de piauí (*Leporinus macrocephalus*) submetidos a banhos terapêuticos de 0,5 e $1,0\text{mg.L}^{-1}$ do inseticida.

Draredja e Soltani (2001) constataram que o DFB provocou atraso no crescimento do peixe mosquito *Gambusia affinis* expostos por 24 horas a concentração de 78mg.L^{-1} . Essa mesma espécie exposta durante 15 dias a 200mg.L^{-1} de DFB, apresentou aumento na excitabilidade 2,5 vezes superior ao grupo controle com dois dias de exposição. O comportamento do grupo exposto ao DFB só voltou a ser semelhante ao grupo controle após 14 dias de exposição ao inseticida, demonstrando que a espécie foi capaz de ajustar ou compensar a presença do DFB (ELLGAARD et al., 1979).

Tanner e Moffet (1995) constataram redução de 97% na taxa de crescimento das larvas de perca (*Lepomis macrochirus*) expostas a 30mg.L^{-1} de DFB e 86% no crescimento de larvas desses peixes, quando com concentrações de $2,5\text{mg.L}^{-1}$.

Avaliar as condições de saúde de peixes neotropicais frente a um agente potencialmente contaminante, como o Dimilin®, é importante para se avaliar o risco ambiental e sugerir critérios para seu uso.

Exemplares de jovens *Prochilodus lineatus* foram expostos a concentração subletal de 100mg.L^{-1} de Dimilin® em testes de toxicidade estáticos agudos durante 6, 24 e 96h. O inseticida causou redução do número de eritrócitos e aumento do seu volume, assim como decréscimo do conteúdo de hemoglobina após 96h de exposição, provavelmente devido a hemólise dos eritrócitos (MADUENHO, 2007). Além disso, a ocorrência de lesões histológicas hepáticas, mesmo sendo moderadas, pode prejudicar o funcionamento deste órgão. Estas alterações observadas podem interferir na manutenção da homeostase dos peixes e indicam que nas condições experimentais empregadas, o Dimilin® é tóxico para *P. lineatus* (MADUENHO, 2007; MADUENHO et al. 2008).

A acumulação de xenobióticos hidrofóbicos pode mudar em função de características inter e intra-espécies. De acordo com Orne e Kegley (2007), os fatores de bioconcentração do DFB variam de 5mg.L^{-1} para a tilápia (*Oreochromis niloticus*) a $0,001- 0,005 \text{ mgL}^{-1}$ para a perca (*Lepomis macrochirus*).

Segundo Schaefer et al. (1980), o DFB pode se acumular em tecidos e órgãos de peixes após a administração na água. Esses autores observaram ainda o acúmulo cerca de 40 vezes maior que a concentração inicial (13mg.g^{-1}) no primeiro dia pós-aplicação do xenobiotico, sendo que no músculo de peixes o valor é de até 160 vezes a concentração inicial.

De acordo com estudos de Chhabra et al. (1990,1991), existem evidências de toxicidade, imunotoxicidade e carcinogênese em ratos e camundongos em relação a um de seus metabólitos, o 4-cloroanilina.

Em humanos, alguns trabalhos relatam toxicidade, imunotoxicidade e carcinogenogenese em relação ao metabólito 4-cloroanilina do DFB (CHHABRA et al., 1990, 1991). Em pessoas que tiveram contato com este produto durante a manipulação, em curtos períodos de exposição, foi constatada a ocorrência de sulfametahemoglobina e, para períodos prolongados de exposição, a ocorrência de metahemoglobina (USEPA, 1997).

2.6 O peixe mato grosso *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882)

A Ordem Characiformes é um dos principais grupos de peixes neotropicais de água doce, composta por 18 famílias, com cerca de 270 gêneros e aproximadamente 1674 espécies descritas. Caracterizam-se por possuir dentes bem desenvolvidos, nadadeira adiposa usualmente presente, corpo quase sempre coberto de escamas, nadadeira pélvica presente, nadadeira anal curta a moderadamente longa, linha lateral usualmente curvilínea e, às vezes, incompleta, mandíbula superior não protraída, dentes faríngeos freqüentemente presentes (NELSON, 2006). Os membros desta ordem são freqüentemente pequenos e a maioria apresenta cores chamativas, característica importante para serem utilizados como peixes ornamentais (NELSON, 2006).

Dentro desta Ordem, encontram-se os peixes correspondentes ao gênero *Hyphessobrycon*, identificado pela presença da nadadeira adiposa, linha lateral

incompleta, boca com duas séries de dentes premaxilares e o formato dos dentes não necessariamente cônicos, com as escamas preventrais organizadas em mais de uma fileira, e sem escamas na nadadeira caudal (EIGENMANN, 1917; GÉRY, 1977).

As espécies pertencentes ao gênero *Hyphessobrycon*, anteriormente alocadas em Tetragonopterinae atualmente constituem um dos grupos de *Incertae sedis* da família Characidae. O gênero *Hyphessobrycon* possui 97 espécies descritas até o momento (LIMA et al., 2003).

Fazem parte dos chamados “tetras americanos”, peixes utilizados no comércio de ornamentais, destacando-se pela diversidade de formas, cores brilhantes, comportamento pacífico e pelo seu tamanho geralmente pequeno (BERRA, 2001).

Os peixes pertencentes à espécie *Hyphessobrycon eques* (Figura 1), conhecidos popularmente pelo nome de mato grosso, durante muito tempo foram considerados *Hyphessobrycon callistus* (WEITZMAN e PALMER, 1997). Apresentam tamanho padrão de 32,0mm podendo atingir no máximo 58,0mm. Possuem boca terminal, mancha umeral escura, grande e transversalmente alongada, nadadeiras avermelhadas, nadadeira dorsal com mácula escura e anal com extremidade escura (GRAÇA e PAVANELLI, 2007).

Vivem em rios e lagoas alimentando-se de algas e plantas. Sua distribuição original se dá nas bacias dos rios Amazonas e Paraguai (HAHN et al., 2004). É espécie de comportamento gregário que se posiciona perto da superfície entre as hastes de plantas, sendo encontrada frequentemente em águas estagnadas. Alimentam-se de vermes, crustáceos, insetos e plantas (HAHN et al., 2004). Seu modo reprodutivo é ovíparo.

Esta espécie faz parte de um complexo de tetras “sanguíneos”, híbridos, produzidos facilmente por produtores, e que são oferecidos geralmente no comércio de aquários (WEITZMAN e PALMER, 1997). A introdução dessa espécie de peixes no rio Glória, Muriaé/MG, pode estar relacionada à grande utilização por aquarofilistas.

As estratégias reprodutivas em peixes ornamentais são complexas, e a maioria delas não é bem entendida. No entanto, protocolos de reprodução em espécies de algumas famílias, incluindo a família Characidae, são praticados sem se conhecer aspectos morfológicos da espermatogênese e espermiogênese (GWO et al., 2005).



Figura 1. *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (GOULART, 2012).

2.7 Anatomia testicular de teleósteos

Os testículos de peixes teleósteos caracterizam-se, principalmente, por serem órgãos pares alongados, envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo (túnica albugínea) (GRIER, 1993).

Estão localizados na cavidade celômica, dorsalmente ao canal alimentar, ventralmente aos rins, e ventrolateralmente à bexiga natatória, onde encontram-se presos juntamente ao celoma pelo mesórquio (LE GAC e LOIR, 1999).

Os testículos mostram-se individualizados em toda a sua extensão, podendo se unir na extremidade caudal para formar o ducto espermático comum, que se abre na papila urogenital (GRIER, 1993; LE GAC e LOIR, 1999).

2.7.1 Anatomia testicular do *H. eques*

O *Hyphessobrycon eques* apresenta testículos pares, alongados, localizados dorsalmente na cavidade celomática, unidos à bexiga natatória na região cranial e aos rins na região caudal (MOJICA, 2007).

A coloração dos testículos nas três espécies do gênero *Hyphessobrycon* apresenta-se branco-leitosa quando maduros, semelhantemente aos demais teleósteos. Os testículos apresentam comprimento médio de 11,9 mm e largura média de 0,95 mm (MOJICA, 2007).

Os testículos estão individualizados na maior parte de sua extensão, revestidos por uma túnica albugínea, unindo-se na extremidade caudal formando o ducto espermático comum, que conflui para a papila urogenital (MOJICA, 2007).

2.7.2 Características histológicas testiculares do *H. eques*

Estão presentes seis tipos de células da linhagem espermatogênica, de acordo com as fases do processo espermatogênico: espermatogônias primária e secundária, espermatócitos primário e secundário, espermatíde, e espermatozóide. Sua caracterização (Figura 2) conduzida por Mojica (2007) é transcrita nos parágrafos seguir.

As espermatogônias primárias são as maiores células germinativas encontradas em *H. eques*. Apresentam citoplasma acidófilo, claro e abundante, cujo limite pode ser observado com dificuldade devido ao grande número de ribossomos ao redor. O núcleo é grande e esférico, localizando-se na região central do citoplasma. As espermatogônias secundárias são semelhantes às espermatogônias primárias; contudo, são menores, com núcleo basófilo e grande, ocupando quase todo o volume celular (MOJICA, 2007).

Espermatócitos I são marcados por condensações progressivas da cromatina e aparecimento de organização do mapa cromossômico em prófase I. Num estágio mais avançado, os únicos elementos axiais irrecuperáveis aproximam um do outro, tornando-se mais perto da membrana nuclear e formando complexos sinaptonêmicos. Espermatócitos II são formados após a segunda divisão meiótica, e são caracterizados pela densificação da cromatina, formação de aglomerados de cromatina opaca no núcleo, e sinais de formação de centríolo no citoplasma (MOJICA, 2007).

As espermatídes são menores que os espermatócitos secundários. São numerosas dentro dos cistos e apresentam núcleo esférico com cromatina em diferentes graus de condensação. Espermatozoides são encontrados agrupados dentro dos cistos, sendo as menores células da linhagem espermatogênica, estando presentes na região mais central dos túbulos e, em algumas vezes, seu flagelo é visível (MOJICA, 2007).

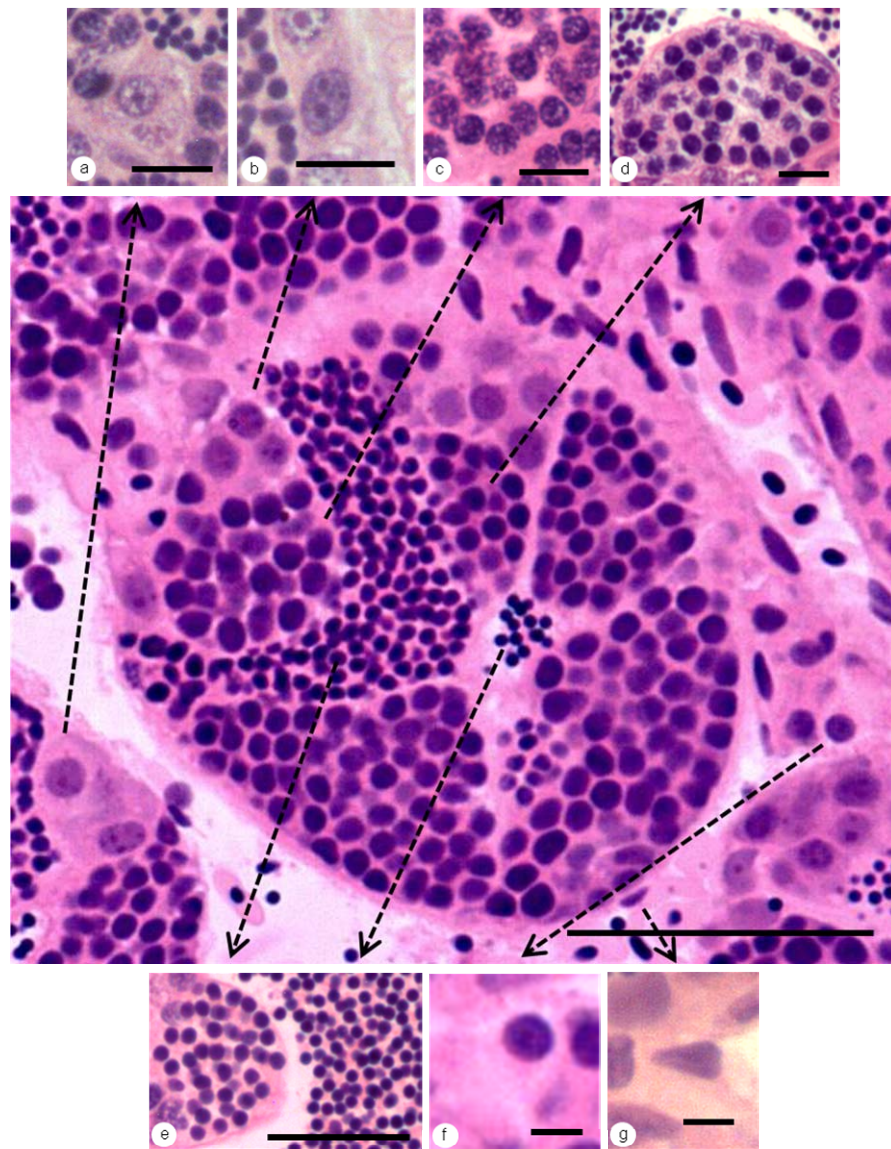


Figura 2: Organização estrutural do testículo de *H. eques*.: a. Espermatogônia A ou primária; b. Espermatogônia B ou secundária; c. Cisto de espermatócito primário; d. Cisto de espermatócito secundário; e. Cisto de espermatíde e espermatozoides no lume tubular; f. Célula de Leydig; g. Célula de Sertoli. Hematoxilina-Eosina. Barras: a-d (12 μ m); e (25 μ m); f-g (5 μ m); centro (50 μ m). (GOULART, 2012).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Na piscicultura, alguns produtos têm sido utilizados no controle de ectoparasitas e insetos aquáticos, e entre eles, o Dimilin[®], inseticida com ação direta na água ou na ração. Contudo, na ausência de formulações para uso em peixes cultivados, surgem protocolos terapêuticos repletos de incertezas quanto à sua eficácia e impacto ambiental.

O manejo incorreto desse produto, além da contaminação do ambiente aquático e dos organismos de cultivo, podem causar efeitos subletais nos peixes. Os efeitos do inseticida em órgãos ou tecidos específicos podem ser avaliados por meio de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos que têm apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos de xenobióticos sobre os peixes.

Outro aspecto importante a ser abordado, é o fato do diflubenzuron, produto para uso agrícola, estar sendo também utilizado para o controle de ectoparasitos, principalmente carrapatos em bovinos e, por essa via, pode também atingir o ambiente aquático.

Este estudo avalia a toxicidade de diferentes concentrações do Dimilin[®] para os testículos em ensaio laboratorial com 96h e 17 dias de duração.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivos:

- Determinar a CL₅₀-96h do Dimilin[®] para machos adultos de *H. eques*; e
- Avaliar os efeitos do Dimilin[®] sobre as características histológicas do testículo de *H. eques*, comparando-os com os animais do grupo controle.

Além de se avaliar o efeito do DFB sobre as características histológicas do testículo, este estudo pode ser usado como base para outras propostas que visam o emprego de produtos químicos como medicamento em peixes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Normas de conduta para o uso de animais na pesquisa

Os testes de determinação da CL₅₀ e de toxicidade aguda e crônica do Dimilin® para o peixe Mato Grosso (*Hyphessobrycon eques*), as análises histológicas e morfométricas, e a documentação fotográfica foram realizados no Departamento de Veterinária (Laboratório de Peixes, Laboratório de Técnicas Histológicas, Laboratório de Histopatologia e Setor de Cirurgia) da Universidade Federal de Viçosa.

Todo o material e as metodologias utilizadas nos ensaios são indicados nas normas de bioensaios estabelecidas pelas resoluções do CONAMA (2006) para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.

Todos os procedimentos envolvendo os animais seguiram as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (protocolo n. 102/2011), e foram realizados e supervisionados pelo Dr. Laércio dos Anjos Benjamin, CRMV-MG 3387.

4.2 Animais

Os exemplares de mato grosso utilizados nesses ensaios foram obtidos em tanques de cultivo de pisciculturas da região de Muriaé/MG e transportados para o Laboratório de Peixes do Departamento de Veterinária da UFV.

Os animais passaram por um período prévio de aclimação de aproximadamente 15 dias em aquários de 50L, com sistema de aeração contínua, filtro mecânico, fotoperíodo de 12h e troca de água diária inferior a 10% do volume do aquário. A temperatura foi controlada em 25±1°C por meio de termostatos e termômetros, sendo sua aferição realizada duas vezes ao dia no mesmo instante em que foi disponibilizada alimentação *ad libitum* para os peixes (ração comercial com 28% de proteína bruta).

Os peixes para o experimento foram padronizados de acordo com o comprimento padrão (35mm) e peso (0,60g) para se trabalhar com amostra o mais homogênea possível.

4.3 Produto químico

Foi utilizado o composto 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)ureia (Diflubenzuron), distribuído comercialmente com o nome Dimilin[®], fabricado pela empresa Chemtura Indústria Química do Brasil Ltda, apresentado na forma de pó molhável.

4.4 Análise de água

Antes da aplicação do inseticida na água, foram coletadas amostras de água, para análise de parâmetros físicoquímicos.

Ao término dos experimentos, novas amostras de água foram coletadas, sendo estas submetidas à análise na Divisão de Água e Esgoto da UFV.

Os parâmetros avaliados foram pH, dureza, oxigênio dissolvido (OD), turbidez e cloretos, de acordo com os procedimentos dispostos no Standard Methods (EATON et al., 2005).

Amônia foi monitorada diariamente no laboratório, juntamente com a temperatura, utilizando-se de um *kit* de teste para aquário Modelo Labcon test (Alcon Ltda, Camboriú, SC).

4.5 Ensaio toxicológicos

4.5.1 Diluição do inseticida Dimilin[®] na água

Os experimentos de avaliação dos efeitos da exposição do mato grosso ao inseticida Dimilin[®] foram conduzidos em aquários experimentais. A solução padrão foi preparada a partir da pesagem de 5g de Dimilin[®] contendo 1250mg de DFB que foi diluído em 1L de água a partir do produto comercial (250g de DFB/Kg de Dimilin[®]).

O inseticida foi aplicado diretamente na água, simulando a aplicação para controle de ectoparasitos em viveiros de peixes. Não ocorreu renovação de água.

4.5.2 Determinação da CL₅₀-96h do Dimilin® para *H. eques*

De acordo com as normas técnicas de testes em sistemas estáticos NBR 15088 (ABNT, 2006), os testes preliminares foram conduzidos durante 96 horas, sem substituição ou sifonagem de água e sem alimentação durante o período de exposição ao Dimilin®.

O monitoramento da mortalidade e retirada de peixes mortos, a avaliação do comportamento dos peixes, e a aferição da temperatura da água foram realizados a cada seis horas.

O objetivo desse ensaio foi determinar a menor concentração que provocasse 100% de mortalidade e a maior concentração que causasse 0% de mortalidade nos animais testados.

Foram estabelecidas seis concentrações para cada repetição que constituíram os tratamentos experimentais.

Foram utilizadas seis concentrações de diflubenzuron calculadas a partir da concentração do DFB no produto comercial Dimilin® (0, 5, 15, 45, 135 e 405 mg.L⁻¹), e distribuídas de forma inteiramente casual, com 3 repetições cada. Para cada concentração foram utilizados três recipientes de plástico com 1,5L de água com cinco animais cada, totalizando 15 animais por concentração.

O programa utilizado para determinar a CL₅₀-96h foi o TOXCALC (USEPA, versão 1.5), com o cálculo de determinação binomial reduzindo o intervalo de confiança por média móvel (P<0,05).

4.5.3 Testes de toxicidade de 96h e 17 dias

Para se estudar os efeitos do Dimilin® sobre os testículos do mato grosso, foram conduzidos dois experimentos.

Inicialmente, foi realizado um teste com duração de 96h. Foram utilizadas as concentrações de 0,01; 0,1; e 1 mg.L⁻¹ de Dimilin®, simulando as concentrações utilizadas nos tratamentos de ectoparasitos, e convencionalmente adotadas por pisciculturas, e um grupo controle sem a droga.

Para cada concentração foram utilizadas três repetições, totalizando 12 aquários de 50L, com 10 peixes /aquário, para cada concentração do inseticida

testado. Seguindo-se as recomendações para realização de testes de toxicidade aguda, os peixes não foram alimentados durante o período de exposição.

Outro teste foi conduzido durante 17 dias, simulando as condições de tratamento nas pisciculturas. Foram utilizadas as mesmas concentrações do teste de 96h e um grupo controle sem a droga, com três repetições, totalizando 12 aquários de 50L, com 10 peixes/aquário, para cada concentração do inseticida testado.

Em cada aquário foram realizadas duas aplicações de Dimilin[®], com três dias de intervalo entre as aplicações, com as aplicações sendo realizadas no primeiro e quarto dias do experimento (MABÍLIA et al, 2004).

Durante a realização do teste, os peixes foram alimentados normalmente.

Durante o período de exposição ao Dimilin[®], os peixes foram monitorados quanto ao comportamento social, mortalidade e movimentação na água.

Ao final dos períodos propostos (96h e 17 dias), os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína 1:10000 para obtenção de medidas de comprimento total e padrão, e de peso corporal. O peso foi obtido utilizando-se balança digital com três casas decimais, e as medidas de comprimento obtidas com auxílio de paquímetro. Na sequência, os peixes foram eutanasiados por secção na transição cabeça-tronco para coleta de testículos para estudo histológico.

4.5.4 Coleta de amostras e processamento para estudo histológico

Os peixes foram eutanasiados e os testículos coletados foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1mol.L⁻¹ e pH 7,2 durante 24h. Em seguida, foram lavados e mantidos em álcool 70% para preservação.

Após esse processo, os fragmentos foram pré-infiltrados em solução de resina:álcool 1:1, por 12h, em temperatura ambiente, seguido de infiltração em resina pura por 24h.

Após este período, realizou-se o emblocamento em resina pura com endurecedor. As amostras foram incluídas em moldes apropriados e colocadas em estufa (60°C/24h). Após a polimerização da resina, as amostras foram fixadas em blocos de madeira para a realização da microtomia.

Na microtomia, os fragmentos foram seccionados em cortes de 3µm de espessura em micrótomo rotativo Leica RM2155 dotado de navalha de vidro. Os

cortes foram selecionados, no sistema semi-seriado 1:6 (coletando-se um e descartando-se cinco subsequentes). Foram utilizadas nove secções histológicas por lâmina, sendo produzidas três lâminas por animal.

Os corantes utilizados foram hematoxilina-eosina e azul de toluidina. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck). Os cortes foram analisados em fotomicroscópio Olympus CX31 e as imagens digitais obtidas em câmera digital SC 020 por meio do software Olympus AnalySIS getIT, nos aumentos de 10X, 20X e 40X.

As lâminas foram examinadas em toda sua extensão em busca de alterações histopatológicas representativas do efeito do Dimilin® no tecido testicular, sempre comparando estas alterações com o padrão de organização dos testículos das lâminas do grupo controle e com descrições da literatura (MOJICA, 2007).

4.5.5 Análise histológica

A análise histológica consistiu de duas etapas: análise morfométrica e análise histopatológica.

Após a captura das imagens, os estudos morfométricos foram realizados utilizando-se o programa computacional de análise de imagens Image-Pro Plus® Version 4.1 (Media Cybernetics - USA).

Foram amostrados 10 animais por tratamento e, para cada animal, foram analisados 10 campos, comparando-se o arranjo estrutural do tecido dos animais de cada tratamento com o arranjo dos animais do grupo controle.

Os dados morfométricos foram obtidos por meio de mensurações de diâmetro de 10 núcleos de células da linhagem espermatogênica (espermátogônias A e B, e espermátócitos I e II), de cistos de espermátócitos I e II, de cistos de espermátides, e de túbulos seminíferos.

O diâmetro nuclear médio das espermátogônias e dos espermátócitos, e o diâmetro médio dos cistos de espermátócitos e espermátides e o diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi calculado a partir do valor de dois diâmetros dispostos perpendicularmente entre si.

As mensurações foram realizadas utilizando-se imagens obtidas em objetiva 40X para núcleos de espermátogônias A e B e de espermátócitos I e II, em objetiva

de 20X para cistos de espermatócitos I e II e cistos de espermátides, e objetiva de 10X para mensurações de túbulos seminíferos (Figura 3).

Foram também computados os números absolutos de cistos e células por campo de 1mm² de área, em 10 campos por animal.

Para as análises histopatológicas dos testículos, as patologias foram quantificadas utilizando-se 10 campos/animal. Para a contagem, utilizou-se gradícula de 0,01mm² com 441 pontos de interseção (Figura 4), computando-se estruturas posicionadas no limite da área da gradícula que se encontravam ou não com alterações.

As principais alterações histológicas consideradas foram vacuolização citoplasmática de espermatogônias, vacuolização citoplasmática de espermatócitos, espermatócitos no lume do túbulo seminífero, retração do lume tubular, picnose nuclear em espermatócitos I e II, hemácias fora de vasos e fibrose. Também foram computados os pontos sobre o tecido sadio.

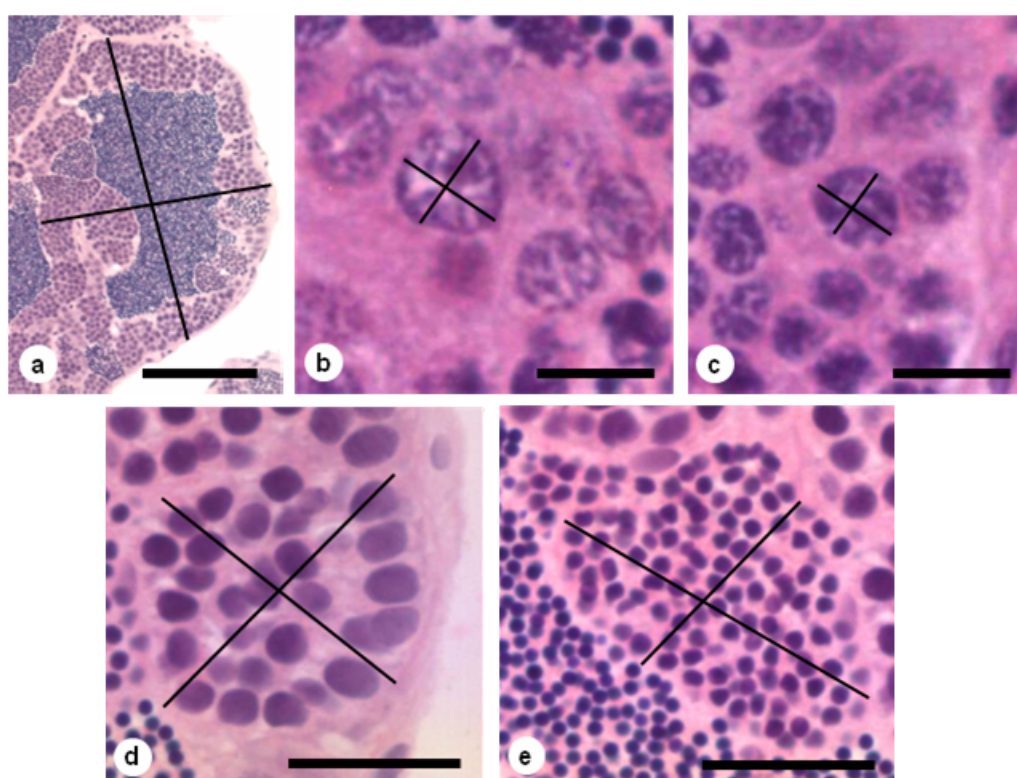


Figura 3. Fotomicrografia de testículos de *H. equus* demonstrando obtenção de medidas morfométricas de diâmetro de (a) túbulos seminíferos; (b) núcleo de espermatogônia A; (c) núcleo de espermatogônia B; (d) cisto de espermatócitos I; (e) cisto de espermatócitos II. Hematoxilina-Eosina. Barras: a (100µm); b, c (5µm); d, e (25µm).

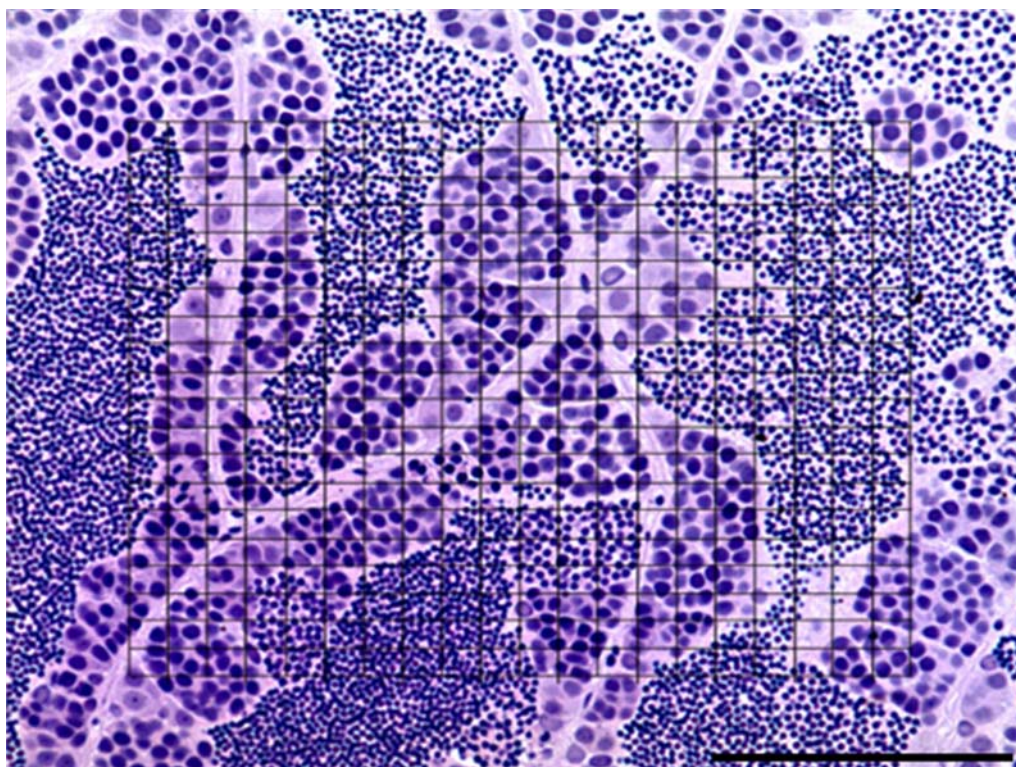


Figura 4. Fotomicrografia do testículo de *H. equus* demonstrando a metodologia de contagem nas análises morfológicas utilizando gradícula de 0,01mm². Azul de toluidina. Barra: 100μm.

4.6 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran e Bartlett) e, posteriormente, à análise de variância. Quando apresentaram significância, foi realizado o teste de comparação de médias mais apropriado, evitando-se erros estatísticos tipo I e II, ou teste F, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Quando não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos aos testes não-paramétricos de Wilcoxon ou Kruskal-Wallis, dependendo do grau de liberdade de tratamentos (SAEG, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da CL₅₀-96h do Dimilin® para *H. eques*

Durante a realização do teste para determinação da CL₅₀ do Dimilin® para o peixe mato grosso, foi observado comportamento anormal nos peixes, caracterizado por nado errático, busca por oxigênio na superfície dos recipientes, tentativa de fuga e paralisia da natação pré-morte. Apesar de presente em todas as concentrações, houve maior intensidade e frequência desses comportamentos na concentração de 405mg.L⁻¹. Esses comportamentos foram observados, com menor intensidade e frequência nas concentrações de 45 e 135 mg.L⁻¹. Essas alterações também foram observadas por Montoya (2008) em *Oreochromis niloticus*, por Silva Filho (2010) em *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao Thiodan® (endossulfan), e por Nunes (2011) em *H. eques* com Roundup Transorb®.

Como informações ecológicas do produto (CHEMTURA, 2006), têm-se os dados de toxicidade aguda do DFB para organismos aquáticos. No tempo de exposição de 96h para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a CL₅₀ foi de 106,4mg.L⁻¹, e para o peixe-zebra (*Brachydanio rerio*), foi de 64,8mg.L⁻¹. A CL₅₀-96h do DFB calculada por FISHER & HALL (1992) para truta arco-íris com peso corporal médio de 1,5g, sob condições de pH 7,4 e temperatura de 10°C, foi de 240mg.L⁻¹. Entretanto, há que se ressaltar que estes valores se referem a peixes de águas temperadas. Como é sabido, o efeito tóxico de um produto está relacionado à temperatura do ambiente que o animal vive. Em águas tropicais, com temperaturas mais elevadas, os valores tendem a serem inferiores, como observado no presente estudo. Para o *Poecilia reticulata* com quatro semanas de idade, concentrações inferiores a 36µg.L⁻¹ não causaram qualquer efeito sobre a espécie, utilizando-se condições de pH 7,3 e temperatura de 20°C (NEBEKER et al., 1983).

A CL₅₀ calculada nesse teste foi de 22,4mg.L⁻¹, e o intervalo de confiança obtido pela média móvel foi de 13,9 a 34,8 mg.L⁻¹ (P<0,05). O teste demonstrou que a concentração de 405mg.L⁻¹ de Dimilin® foi suficiente para levar à morte todos os peixes em apenas 66h (Tabelas 2 e 3). A mortalidade do grupo controle foi inferior a 20%, dentro do limite máximo aceito pela norma vigente para realização do teste de toxicidade aguda em sistema de água estático, validando os dados (ABNT, 2006).

A temperatura da água variou entre 22°C e 23,5°C, com valor médio de 22,4°C, sendo a maior temperatura registrada no horário de 0h, e as menores temperaturas registradas nos horários 66 e 90h.

Tabela 2. Mortalidade absoluta (n° de indivíduos) em função do tempo de exposição do *H. eques* ao Dimilin® durante o teste de determinação da CL₅₀-96h.

Mortalidade/Tempo de exposição				
Tratamento	24hs	48hs	72hs	96hs
Controle	0	0	0	0
5mg.L ⁻¹	0	1	0	0
15mg.L ⁻¹	1	1	4	0
45mg.L ⁻¹	3	4	0	4
135mg.L ⁻¹	3	4	4	3
405mg.L ⁻¹	6	7	2	0

Tabela 3. Mortalidade acumulada (%) em função do tempo de exposição do *H. eques* ao Dimilin® durante o teste de determinação da CL₅₀-96h.

Mortalidade acumulada (%)/Tempo de exposição				
Tratamento	24hs	48hs	72hs	96hs
Controle	0,0	0,0	0,0	0,0
5mg.L ⁻¹	0,0	6,6	6,6	6,6
15mg.L ⁻¹	6,6	13,4	40,0	40,0
45mg.L ⁻¹	20,0	46,7	46,7	73,3
135mg.L ⁻¹	20,0	46,7	73,3	93,3
405mg.L ⁻¹	40,0	86,6	100,0	100,0

Estudos com diferentes espécies de peixes para a determinação da concentração letal média em 96h (CL₅₀) de DFB indicam que um dos metabólitos do DFB, a 4-cloroanilina, que se encontra na lista de produtos químicos perigosos da Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico de São Paulo (CETESB, 2007), apresenta elevada toxicidade para peixes, sendo maior que a do próprio produto de origem (FISHER e HALL, 1992).

5.2 Análise de água

Os parâmetros indicadores da qualidade da água utilizada para realização do experimento foram aferidos para garantir que estas alterações não ocasionassem a mortalidade ou mesmo alterações na toxicidade do produto sobre o animal e, especialmente, sobre os testículos. A água foi mantida em condições adequadas para os peixes ao longo dos períodos experimentais

As tabelas 4 e 5 mostram que todos os parâmetros mensurados encontraram-se em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais em geral (HUET, 1983), bem como com a resolução nº 357 do CONAMA (2005).

Tabela 4. Parâmetros físicoquímicos da água no teste de toxicidade de 96h do Dimilin® para *H. eques*.

Análise	Início		Final			Valor de Referência
	Controle	Concentração 0,01mg.L ⁻¹	Concentração 0,1mg.L ⁻¹	Concentração 1mg.L ⁻¹		
pH	6,0	6,3	6,2	6,1	6,2	6,0-9,0 (*)
Temperatura (°C)	25	24	24	24	24	22-26 (**)
Turbidez (UNT)	0,42	0,43	0,71	0,62	0,62	<40,00 (*)
OD (mg.L ⁻¹)	6,5	7,2	7,4	7,4	7,2	
DBO (mg.L ⁻¹)	3	1,0	1,0	0	2	<5, 0 (*)
Amônia (mg NH ₃ .L ⁻¹)	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0 a 0,25 (*)
Cloro (mgCl ₂ .L ⁻¹)	<limite	<limite	<limite	<limite	<limite	0,01 (*)
Dureza Total (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	24,5	22,9	24,5	27,8	31,0	20-400 (***)

(*) CONAMA 357/05 (Classe 2 - Conselho Nacional do Meio Ambiente.

(**) CASAL (2010).

(***) SWANN (2008).

Tabela 5. Parâmetros físicoquímicos da água no teste de toxicidade de 17 dias do Dimilin® para *H. eques*.

Análise	Início		Final			
Parâmetros		Controle	Concentração 0,01mg.L ⁻¹	Concentração 0,1mg. L ⁻¹	Concentração 1mg. L ⁻¹	Valor de Referência
pH	6,0	7,9	8,0	7,7	7,6	6,0-9,0 (*)
Temperatura (°C)	25	25	25	25	25	22-26 (**)
Turbidez (UNT)	0,42	0,54	0,61	0,93	0,94	<40,00 (*)
OD (mg.L ⁻¹)	6,5	6,7	6,8	6,7	6,7	
DBO (mg.L ⁻¹)	3	0	0	0	0	<5, 0 (*)
Amônia (mg NH ₃ .L ⁻¹)	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0 a 0,25 (*)
Cloro (mgCl ₂ .L ⁻¹)	<limite	<limite	<limite	<limite	<limite	0,01 (*)
Dureza Total (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	24,5	27,4	28,6	26,1	26,9	20-400 (***)

(*) CONAMA 357/05 (Classe 2) - Conselho Nacional do Meio Ambiente.

(**) CASAL (2010).

(***) SWANN (2008).

A escolha do uso de água tratada para consumo humano, livre de cloro, mantida em caixa d'água de 1000L mostrou-se adequada; a manutenção dessa água durante 10 dias, com aeração contínua, antes da aclimação dos animais nos aquários visou reduzir o cloro molecular, controlar a temperatura e estabilizar os demais parâmetros físicoquímicos.

Os valores da temperatura aferida ficaram entre os desejados para cultivo e criação da espécie *H. eques*, cuja faixa ideal é de 22 a 26°C (CASAL, 2010), propiciando estudar a resposta ao agrotóxico em condições ideais nesse parâmetro.

O bom crescimento dos peixes ocorre com níveis de oxigênio superiores a 6mg/L. O pH recomendado para peixes tropicais encontra-se entre 7 e 8, e valores inadequados podem prejudicar o desempenho. No presente estudo, o pH esteve dentro da faixa considerada ideal para a espécie que é de 5,0 a 7,8 (Casal, 2010),

Níveis de amônia entre 0,15 e 1,0 mg/L podem levar à diminuição do crescimento dos peixes, enquanto exposições contínuas ou frequentes a 0,2mg/L podem ser prejudiciais para os animais. Os teores médios de amônia não ionizada encontrados nos presente experimentos (0 a 0,25 ± 0,001 mg/L) não apresentaram qualquer risco de toxicidade para os animais por encontrarem-se dentro dos níveis de tolerância estabelecidos para peixes neotropicais (HUET, 1983; KUBITZA et al.,

1999). Para Swann (2008), valores de dureza total aceitáveis estão entre 20-400 mg/L, valores de dureza total maiores que 20mg/L devem ser mantidos para ótimo crescimento de organismos aquáticos.

5.3 Dados biométricos

As tabelas 6 e 7 apresentam as médias de peso, comprimento total e comprimento padrão de cada grupo experimental após 96h e após 17 dias.

Tabela 6. Valores médios de comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e peso corporal (g) de *H. eques* em cada grupo experimental exposto ao Dimilin® por 96h.

Concentração	n	Comprimento Total	Comprimento Padrão	Peso Corporal
Controle	10	36,56±0,18	29,19±0,15	0,65±0,06
0,01mg.L ⁻¹	10	36,53±0,12	29,44±0,32	0,61±0,08
0,1mg.L ⁻¹	10	37,21±0,10	30,12±0,17	0,63±0,06
1mg.L ⁻¹	10	36,50±0,18	30,59±0,15	0,62±0,11

Valores expressos como média ± desvio padrão.
Não foram encontradas diferenças pelo Teste F (P>0,05).

Tabela 7. Valores médios de comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e peso corporal (g) de *H. eques* em cada grupo experimental exposto ao Dimilin® por 17 dias.

Concentração	n	Comprimento Total	Comprimento Padrão	Peso Corporal
Controle	10	33,23±0,48	27,9±0,39	0,54±0,24
0,01mg.L ⁻¹	10	34,21±0,70	29,01±0,59	0,57±0,19
0,1mg.L ⁻¹	10	35,57±0,26	20,64±0,22	0,63±0,14
1mg.L ⁻¹	10	37,28±0,35	30,77±0,31	0,66±0,11

Valores expressos como média ± desvio padrão.
Não foram encontradas diferenças pelo Teste F (P>0,05).

Dentro da mesma espécie, peixes menores apresentam menor resistência ao Dimilin® quando comparados com peixes maiores (FISHER e HALL, 1992;

NEBEKER et al., 1983). Assim, os grupos experimentais foram constituídos de lotes de tamanhos homogêneos, demonstrados nas tabelas 5 e 6, para evitar que o efeito do tóxico sofresse interferência deste fator, e garantir que todos os animais estivessem em estado de maturação reprodutiva.

5.4 Análises morfométricas

Os testículos de *H. eques*, como observado neste trabalho, encontram-se individualizados em sua maior parte, unindo-se apenas na extremidade caudal. Encontram-se revestidos por uma túnica conjuntiva, denominada de túnica albugínea, que envia septos para o interior do parênquima testicular, separando os túbulos seminíferos, que são numerosos e apresentam-se enovelados e com diâmetro e lume variáveis. Segundo Mojica (2007), eles dispõem-se lado a lado, de maneira bastante uniforme, embora sofram anastomoses, quando o testículo está maduro.

Ainda pode ser observado que internamente, os testículos encontram-se constituídos por dois compartimentos distintos, o intersticial e o tubular, que é formado por cistos. No compartimento tubular, encontram-se cinco tipos de células germinativas, de acordo com as fases do processo espermatogênico, que são espermatogônia primária, espermatogônia secundária, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermatíde e espermatozoide (Figura 5), que são envolvidas por projeções citoplasmáticas das células de Sertoli (MOJICA, 2007). Exceto a espermatogônia primária, as demais células se organizam em cistos, onde todas as células de um mesmo cisto encontram-se no mesmo estágio de desenvolvimento. Os testículos de *H. eques* são classificados como testículos espermatogoniais irrestritos (MOJICA, 2007). Este padrão de organização testicular e os tipos celulares presentes no órgão seguem os padrões descritos para peixes teleósteos e comprovado no presente estudo (GRIER et al., 1980; GRIER, 1981; GRIER, 1993).

A análise histológica do testículo dos grupos expostos ao Dimilin® comparados com o grupo controle não constatou diferença ($P > 0,05$) no diâmetro médio dos núcleos de espermatogônias (Spg) A e B, espermatócitos (Spc) I e II, e dos cistos de Spc I e II, assim como não houve diferença no diâmetro médio de cistos de

espermátides (Spt) e dos túbulos seminíferos, tanto no teste 96h quanto no 17 dias (Tabelas 8 e 9).

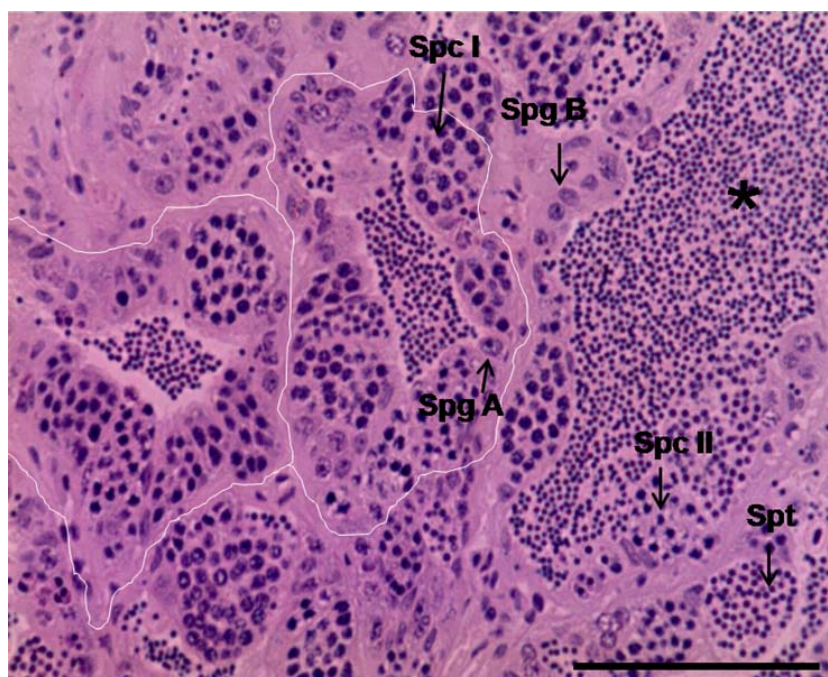


Figura 5. Fotomicrografia da organização estrutural do testículo de *H. eques* do grupo controle. Espermatogônia A (Spg A); espermatogônia B (Spg B); cisto de espermatócito I (Spc I); cisto de espermatócito II (Spc II); cisto de espermátide (Spt); espermatozoide no lume do túbulo seminífero (asterisco); e representação dos limites de dois túbulos seminíferos (linhas brancas). Hematoxilina-Eosina. Barra: 100 μ m.

Tabela 8. Diâmetro médio (μ m) de núcleos de espermatogônias (Spg) A e B, núcleos de espermatócitos (Spc) I e II, cistos de Spc I e II, cistos de espermátides (Spt), e de túbulos seminíferos (TS) de *H. eques* expostos ao Dimilin[®] por 96h.

Parâmetro	Controle	0,01mg.L ⁻¹	0,1mg.L ⁻¹	1mg.L ⁻¹
Spg A	7,27 $\pm$ 1,20	7,25 $\pm$ 1,22	7,24 $\pm$ 1,06	7,30 $\pm$ 0,97
Spg B	6,19 $\pm$ 1,24	6,20 $\pm$ 1,26	6,01 $\pm$ 0,79	6,00 $\pm$ 0,95
Spc I	5,53 $\pm$ 0,38	5,53 $\pm$ 0,86	5,51 $\pm$ 0,81	5,68 $\pm$ 1,14
Spc II	3,51 $\pm$ 0,95	3,34 $\pm$ 0,69	3,68 $\pm$ 0,97	3,57 $\pm$ 0,92
Cisto Spc I	36,03 $\pm$ 8,14	35,17 $\pm$ 7,23	35,72 $\pm$ 9,27	35,36 $\pm$ 10,45
Cisto Spc II	31,57 $\pm$ 8,10	31,42 $\pm$ 8,05	30,77 $\pm$ 6,75	30,21 $\pm$ 6,51
Cisto Spt	32,64 $\pm$ 8,10	32,06 $\pm$ 6,96	31,28 $\pm$ 9,11	31,07 $\pm$ 8,20
TS	232,06 $\pm$ 39,76	230,44 $\pm$ 34,09	224,72 $\pm$ 38,30	229,48 $\pm$ 37,35

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão.
Não foram encontradas diferenças pelo Teste F ($P>0,05$).

Tabela 9. Diâmetro médio (μm) de núcleos de espermatogônias (Spg) A e B, núcleos de espermatócitos (Spc) I e II, cistos de Spc I e II, cistos de espermátides (Spt), e de túbulos seminíferos (TS) de *H. eques* expostos ao Dimilin® por 17 dias.

Parâmetro	Controle	0,01mg.L ⁻¹	0,1mg.L ⁻¹	1mg.L ⁻¹
Spg A	7,44±1,20	7,19±1,19	7,30±0,92	7,22±0,96
Spg B	6,35±1,03	6,57±0,93	6,18±0,65	6,14±0,92
Spc I	5,44±0,49	5,58±0,85	5,46±0,80	5,76±0,79
Spc II	3,90±0,87	3,69±0,69	4,00±0,76	3,83±0,75
Cisto Spc I	38,53±6,88	40,14±6,25	37,84±4,90	39,46±8,39
Cisto Spc II	31,55±8,74	30,66±6,24	29,74±5,98	29,91±5,95
Cisto Spt	32,61±8,85	29,72±4,85	30,37±5,34	31,37±7,19
TS	237,08±35,85	237,76±26,12	231,70±24,91	229,88±28,99

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão.

Não foram encontradas diferenças pelo Teste F ($P>0,05$).

Os valores registrados no presente estudo (Tabelas 8 e 9) foram semelhantes àqueles encontrados por Nunes (2011) para a mesma espécie quando utilizou o Roundup Transorb® e, da mesma forma, não constatou diferenças entre os parâmetros, o que concorda com resultados relatados por Matta et al. (2002) de que as células germinativas, assim como as células de Leydig e de Sertoli, depois de diferenciadas, mantêm um tamanho uniforme, sem interferências da idade, tamanho ou peso do peixe.

No presente estudo não se encontrou redução do diâmetro do túbulo seminífero independente da concentração em qualquer um dos dois experimentos, diferentemente dos resultados encontrados por Nunes (2011) quando estudou o efeito subletal do Roundup Transorb® na morfologia testicular de machos adultos maduros de *H. eques*. Essa redução do diâmetro tubular poderia estar relacionada com a redução do número de células germinativas e da secreção de fluido, produzido pela célula de Sertoli em algumas espécies, conforme relatam Van Haaster et al. (1993).

Silva Filho (2010) encontrou em seu trabalho de avaliação de efeitos do Roundup™ e do Thiodan® em machos adultos de *Astyanax bimaculatus*, que os cistos de Spc II dos grupos expostos ao Thiodan® apresentaram menor diâmetro nas concentrações 1,15 e 2,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, observando aumento no diâmetro de núcleos

de Spc I em todas as concentrações e redução no diâmetro do núcleo de Spc II na menor concentração. Nos estudos com Roundup™, diferenças foram observadas somente para o diâmetro de núcleos de Spc II entre os diferentes grupos, inferindo que o Roundup™ não interferiu nos demais parâmetros. Assim, menor número de células estaria presente nos cistos, o que concorda com observações de Rand e Petrocelli (1985) e de Adams (1990), que a exposição a substâncias tóxicas em diferentes fases do ciclo de vida tem como características gerais, a redução no número e na viabilidade de gametas e a redução do número e viabilidade de descendentes.

Quando se avaliou números de células e de cistos, houve aumento apenas do número de Spg B nos dois experimentos (Tabelas 10 e 11). Dutta et al. (2006), pesquisando o efeito dos poluentes na reprodução dos peixes, relataram a interrupção da fase de proliferação na espermatogênese do bluegill (*Lepomis macrochirus*) após exposição aguda ao diazinon, inseticida organofosforado.

Quando foram confrontados os dados do teste de 96h com o teste de 17 dias, foram observadas diferenças para o diâmetro de núcleos de Spc II entre os diferentes grupos ($p < 0,05$) em todas as concentrações, e nos diâmetros de cistos de Spc I nas concentrações $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e 1 mg.L^{-1} , com os maiores valores sendo registrados nas no teste de 17 dias. O tóxico pode ter provocando aumento do diâmetro da célula, inferindo que o Dimilin® induziu a degeneração deste tipo celular pela exposição prolongada.

Tabela 10. Número de núcleos de espermatogônias (Spg) A e B, de espermatócitos (Spc) I e II, e de cistos de Spc I e II, e de espermatídes (Spt), em 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* expostos ao Dimilin® por 96h.

Parâmetros	Controle	0,01mg.L ⁻¹	0,1mg.L ⁻¹	1mg.L ⁻¹
Spg A	8,09±4,04	5,84±2,83	8,71±3,67	7,82±2,83
Spg B	28,79±12,40c	28,73±12,38c	39,73±12,59a	35,20±11,48b
Spc I	100,65±61,52	76,65±50,84	71,98±42,81	81,54±51,02
Spc II	40,61±49,77	73,27±76,25	50,86±42,12	52,34±41,60
Cisto Spc I	5,75±3,60	5,28±2,91	4,93±3,06	5,00±3,37
Cisto Spc II	1,20±1,73	1,94±1,66	1,88±2,23	2,37±3,66
Cisto Spt	1,09±1,35	1,06±1,82	0,93±1,25	0,69±1,09

Valores expressos como média ± desvio-padrão.

Valores com letras minúsculas subscritas distintas nas linhas indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Tabela 11. Número de núcleos de espermatogônias (Spg) A e B, de espermatócitos (Spc) I e II, e de cistos de Spc I e II, e de espermatídes (Spt), em 0,01mm² de área de testículo de *H. eques* expostos ao Dimilin® por 17 dias.

Parâmetros	Controle	0,01mg.L ⁻¹	0,1mg.L ⁻¹	1mg.L ⁻¹
Spg A	8,09±4,03	5,86±2,84	8,72±3,65	7,76±2,82
Spg B	28,76±12,69c	28,75±12,60c	39,73±12,44a	35,21±11,34b
Spc I	92,95±55,18	72,82±47,56	72,38±42,87	70,70±37,75
Spc II	40,42±49,59	72,97±75,87	50,86±42,04	49,76±38,77
Cisto Spc I	5,31±2,83	5,13±2,94	4,93±3,04	4,27±2,73
Cisto Spc II	1,20±1,72	1,91±1,63	1,89±2,23	1,87±2,66
Cisto Spt	0,96±1,05	1,04±1,81	0,93±1,26	0,68±1,07

Valores expressos como média ± desvio-padrão.

Valores com letras minúsculas subscritas distintas nas linhas indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Duncan.

5.5 Análises histopatológicas

As principais alterações histológicas evidenciadas nos testículos foram vacuolização de espermatogônia, deslocamento da parede dos túbulos, retardo no desenvolvimento celular, ruptura de cisto, degeneração testicular, desarranjo na estrutura dos cistos e fibrose (Figura 6).

Lesões específicas que ocorrem em órgãos de peixes em contato com as substâncias tóxicas em condições laboratoriais ajudam a identificar biomarcadores de exposição. O exame histopatológico tem sido cada vez mais reconhecido como uma valiosa ferramenta para a avaliação do impacto dos poluentes em peixes (TAKAYAMA et al., 1995, FOURNIE et al., 1996; PEEBUA et al. 2008). Estudos de histopatologia de órgãos genitais de peixes têm recebido atenção especial no biomonitoramento da poluição aquática, uma vez que múltiplos processos celulares e fisiológicos estão envolvidos (ANKLEY et al., 2009). Desse modo, faz-se necessário o estudo da histologia gonadal normal para padronização de análises dos efeitos tóxicos, aspecto considerado no presente estudo.

No presente estudo foi possível constatar diferentes tipos de lesões. Uma delas, a vacuolização (Figura 6a), que é uma alteração histopatológica reversível, desde que haja interrupção do contato com a substância lesiva ainda neste estágio. Esses vacúolos são citoplasmáticos, claros e grandes, concordando com descrição de Dietrich e Krieger (2009). Os vacúolos observados nas Spg A e B e nos Spc I e II podem representar degeneração hidrópica. Nos peixes que não foram expostos ao agrotóxico, a vacuolização não foi nula; porém, este valor é consideravelmente baixo em relação aos animais que foram expostos.

Persistindo o contato, podem ocorrer alterações nucleares e as células podem se tornar necróticas. Necrose é a morte celular, no organismo vivo, acompanhada de alterações morfológicas características. A necrose é a manifestação morfológica da lesão celular irreversível (ZAKERI e LOCKSHIN, 2002).

Entretanto, quando as alterações degenerativas progridem, pode aparecer retração do núcleo que se transforma em uma massa densa e enrugada de cromatina, denominada picnose (ZAKERI e LOCKSHIN, 2002), o que para Dietrich e Krieger (2009) representa uma etapa do processo de necrose. Essa situação também observada no presente estudo (Figura 6c).

A substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo denomina-se fibrose (cicatriz), descrita morfológicamente como proliferação aumentada de fibroblastos, seguida de aumento na deposição de colágeno. Fibrose do tecido intersticial também foi alteração notada neste estudo (Figura 6f), e pode ser consequência da exposição, por exemplo, a disruptores endócrinos (DIETRICH e KRIEGER, 2009). Geralmente, há poucos pontos de fibrose em gônadas tanto de machos quanto de

fêmeas (DIETRICH e KRIEGER, 2009), o que está de acordo com os resultados do presente trabalho (Tabelas 12 e 13). Quando há perda de grande quantidade de tecido, as células são incapazes de recompor a arquitetura original do tecido (BALBINO et al., 2005). Em alguns casos, a fibrose em peixes pode ser descrita como um conjunto de inflamações e/ou lesões degenerativas, e pode ocorrer pela estimulação da proliferação de células fibroblásticas facilmente detectadas como alterações patológicas, de acordo com Dietrich e Krieger (2009).

Foram observadas, também, hemácias fora de vasos sanguíneos, o que pode ser indicativo de hemorragia. A presença de hemácias foi registrada em várias áreas do tecido intersticial e em cistos de Spc (Figura 6b). Espermatozoides encontrados fora da luz tubular também foram observados no presente estudo, mas não quantificados, e podem indicar rompimento do túbulo seminífero. Também foram encontrados Spc na luz tubular (Figura 6e), indicativo de rompimento de cistos. O rompimento de cistos e a presença de espermátócitos no lume tubular também foram registrados por Silva Filho (2010), avaliando os efeitos do Thiodan e do Roundup sobre lambaris, e por Nunes (2011) estudando os efeitos do Roundup Transorb sobre o *H. eques*.

Ao analisar a toxicidade aguda do zinco em lambaris Santos (2009) observou correlação positiva entre a concentração de zinco e o aumento na ruptura e no deslocamento de cistos que, segundo a autora, causou retração na parede dos túbulos seminíferos, diferentemente dos resultados deste estudo. No presente estudo foi observada retração do conteúdo (espermatozoides) dentro do lume (Figura 6d). A diferença observada na descrição da alteração nesse trabalho e aquela descrita por Santos (2009) poderia estar relacionada a uma diminuição do diâmetro dos cistos que compõem a parede do túbulo seminífero, parâmetro não quantificado em nenhum dos dois estudos em questão.

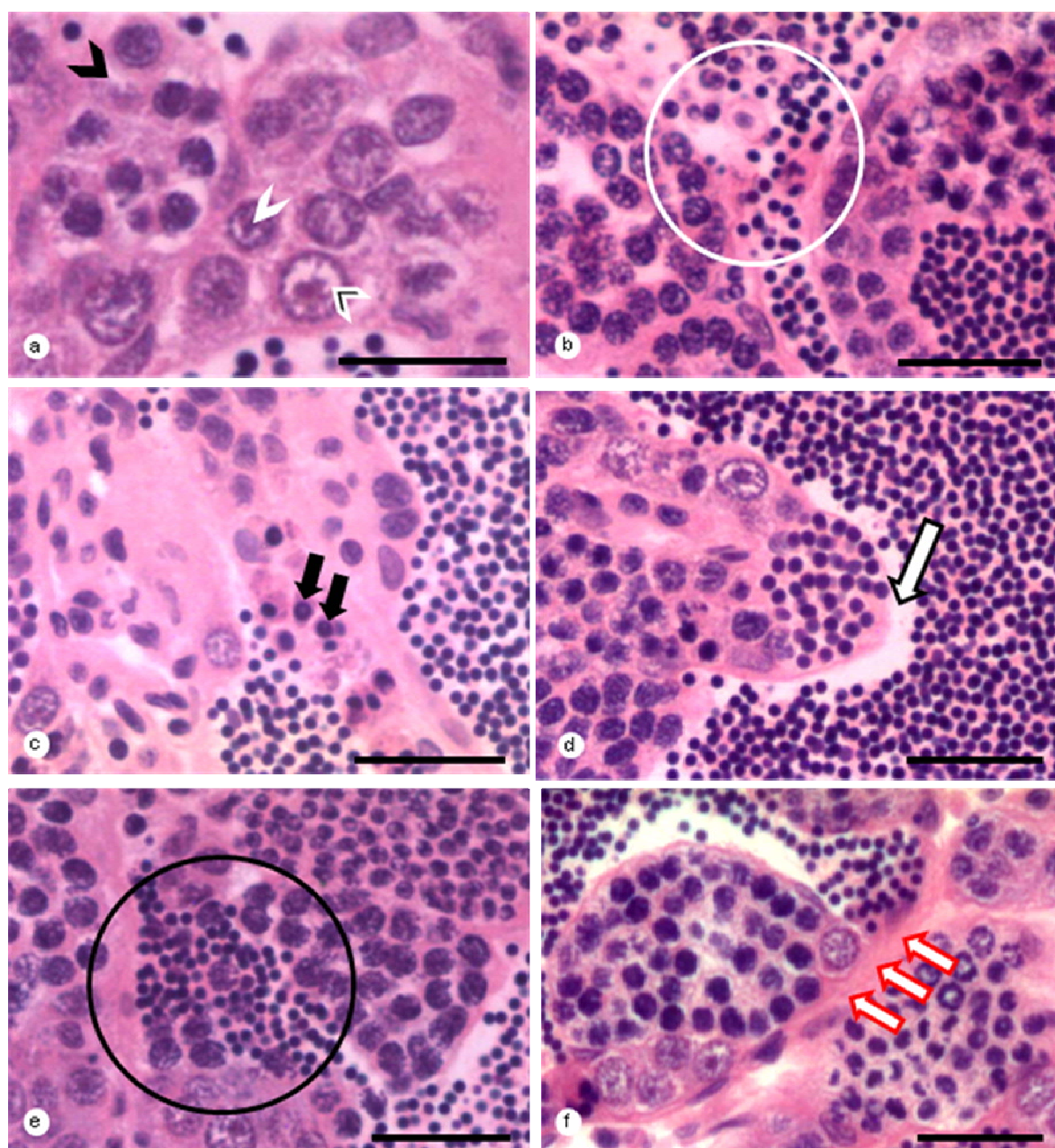


Figura 6. Fotomicrografia de testículo de *H. eques* expostos ao Dimilin®, demonstrando (a) vacuolização espermatogônias B (cabeça de seta branca) e A (cabeça de seta branca e preta), e de espermatócito (cabeça de seta preta); (b) hemácia fora do vaso (círculo branco); (c) picnose nuclear (seta preta dupla); (d) retração do lume tubular (seta preta e branca); (e) espermatócito livre no lume tubular (círculo preto); (f) fibrose (seta vermelha e branca). Hematoxilina-Eosina. Barra: 25 µm.

No presente trabalho, as lesões anteriormente relatadas e descritas, foram contabilizadas, considerando aquelas posicionadas no limite da área da gradícula, encontrando-se com alterações ou não. Nos peixes que não foram expostos ao agrotóxico, alterações semelhantes também foram encontradas; porém, foram relatadas em valor inferior com relação aos animais expostos. Entretanto, diferenças

estatísticas não foram observadas quando se considerou cada uma das alterações individualmente, nas diferentes concentrações de um mesmo experimento, como também entre eles.

Quando se comparou tecido alterado com tecido sadio, que significa a união de todas as alterações em um único parâmetro, tanto para os valores absolutos quanto para os valores percentuais, diferenças ($P < 0,05$) foram registradas entre o controle e todas as concentrações no experimento de 17 dias, mas não foram observadas ($P > 0,05$) no experimento 96h (Tabela 12). A comparação entre cada concentração nos dois diferentes períodos experimentais também não mostrou diferenças ($P > 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12. Porcentagem (%) e número absoluto de pontos de interseção de tecido alterado e sadio contados em $0,01\text{mm}^2$ de área de testículo de *H. eques* expostos ao Dimilin® por 96h e por 17 dias.

Concentração	96h				17 dias			
	TAlt	TSad	%TAlt	%TSad	TAlt	TSad	%TAlt	%TSad
Controle	13,03±12,52	428,19±43,18	2,95±3,01	97,09±2,85	8,45±9,41b	432,54±9,41A	1,91±2,13b	98,08±2,13A
0,01mg.L ⁻¹	15,95±13,20	429,91±44,84	3,62±2,98	96,35±2,92	16,16±13,09a	424,83±13,09B	3,66±2,97a	96,33±2,96B
0,1mg.L ⁻¹	15,38±12,10	425,62±44,11	3,50±9,70	96,51±2,76	15,95±12,49a	425,05±12,09B	3,62±2,83a	96,38±2,83B
1mg.L ⁻¹	14,10±12,00	426,96±12,05	3,18±2,73	96,81±2,73	14,00±12,14a	427,00±12,13B	3,17±2,75a	96,82±2,75B

TAlt: Tecido alterado; TSad: Tecido sadio.

Valores com letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Valores com letras maiúsculas distintas nas colunas indicam diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Tuckey.

Quando expostos a substâncias tóxicas em diferentes fases do ciclo de vida, podem surgir lesões teciduais que comprometem o processo espermatogênico, como o retardamento de fases de desenvolvimento (RAND e PETROCELLI, 1985; ADAMS, 1990; SANTOS, 2009; MORAIS, 2009) e da maturação gonadal (RAND e PETROCELLI, 1985; ADAMS, 1990) que alteram também a taxa reprodutiva da espécie (LANGIANO e MARTINEZ, 2008). Alguns tóxicos podem, ainda, modificar o comportamento do animal e as características sexuais secundárias (LEINO et al., 2005). De um modo geral, as substâncias tóxicas parecem atuar indiretamente sobre o equilíbrio entre os hormônios gonadotróficos, vitelogênicos, dopamina e estrógeno, o que refletirá na diferenciação, maturação, morfologia e fisiologia gonadal. (ADAMS, 1990).

A toxicologia ambiental, como uma área da toxicologia, enfoca os impactos dos poluentes químicos ambientais sobre os organismos biológicos (OTTOBONI, 1991; VAZ et al, 2004). Por viverem imersos na água, os peixes são especialmente afetados quando ela está poluída, absorvendo os poluentes não apenas via alimentos (ANKLEY et al., 2009).

No Brasil, o DFB vem sendo utilizado nas pisciculturas como meio de combate a ectoparasitas (MABÍLIA et al, 2004), embora não registrado como tal. Tanto nos EUA quanto em alguns países da Europa, seu uso é restrito de acordo com a USEPA (1997) por apresentar alto impacto ambiental, com riscos carcinogênicos e imunotoxicidade ao ser humano (CHHABRA et al., 1990, 1991), existindo assim risco ocupacional para quem manipula o produto. Porém, são necessárias pesquisas que averiguem o risco da ingestão no alimento.

O Ministério da Agricultura do Brasil e a ANVISA ainda não estabeleceram nenhum tipo de restrição contra o produto para seu uso na pecuária. Protocolos repletos de incertezas quanto a sua eficácia e impacto ambiental, manejo incorreto e contaminação do ambiente aquático e dos organismos de cultivo podem causar efeitos subletais nos peixes.

Apesar do agrotóxico Dimilin® *pertencer* à classe toxicológica IV (USEPA, 2006), o produto se mostrou levemente tóxico para os testículos em exposições de 96h e moderadamente tóxico com 17 dias de exposição, segundo as concentrações empregadas no presente estudo e que foram adotadas a partir daquelas encontradas na literatura e utilizadas para combate a ectoparasitoses em pisciculturas brasileiras, provocando alterações na morfologia testicular.

Levando-se em consideração essas informações, não deve ser feito o uso desse produto nas pisciculturas para o controle de ectoparasitas em peixes, nem na agricultura, para controle de pragas de cultivos, particularmente nesse caso em que o *H. eques* faz interface com áreas de cultivo onde o produto é extensivamente empregado em plantações que muitas vezes são pulverizadas por aplicação aérea.

Os achados deste estudo precisam ser complementados com novas pesquisas em outros órgãos que podem ser possíveis marcadores de contaminação, como ovário, fígado, brânquias, musculatura e gordura, pois os efeitos podem ser ou não diferentes dos resultados encontrados neste estudo.

6. CONCLUSÕES

A CL_{50} calculada do Dimilin® para o mato grosso *H. eques* foi de 22,4 mg.L⁻¹ com intervalo de confiança de 13,9 a 34,8 mg.L⁻¹ obtido pela média móvel ($P < 0,05$) a uma temperatura média de 22,4°C.

Exposição prolongada ao produto (experimento de 17 dias) nas concentrações utilizadas e que são também empregadas como tratamentos em pisciculturas, alteraram o padrão normal dos testículos como aumento do número de espermatogônias B e aumento no diâmetro de núcleos de espermatócitos II e de cistos de espermatócitos I.

O *Hiphessobrycon eques* pode ser classificado como uma espécie sensível ao Dimilin®.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2. Ed. ABNT: versão corrigida 31/03/2006, 19p. 2006 - Parte 1 - Sistema Estático - Método de Ensaio. Rio de Janeiro, NBR 15088, 2004.
- ADAMS, S.M. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Ed.). **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 333-353, 1990.
- ALTIERI, A., **Argulose ou piolhos d' água**, Data: 15/05/2006. Disponível em <<http://aquariofilia.multiply.com/journal>> Acessado em 30 de março de 2011.
- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 231, 2003.
- ANKLEY, G.T.; BENCIC, D.C.; BREEN, M.S.; COLLETTE, T.W.; CONOLLY, R.B.; DENSLOW, N.D.; EDWARDS, S.W.; EKMAN, D.R.; GARCIA-REYERO, N.; JENSEN, K.M.; LAZORCHAK, J.M.; MARTINOVIĆ, D. MILLER, D.H.; PERKINS, E.J.; ORLANDO, E.F.; VILLENEUVE, D.L. WANG, R.L.; WATANABE, K.H. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. **Aquatic Toxicology**, v.92. p. 168-178, 2009.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2012 <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE C.; INÁCIO A. F.; FREIRE M. M.; EGLER M.; MUGNAI R.; BAPTISTA D. F. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos**. Ciência. Saúde Coletiva, v.12, p. 61-72, 2007.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BERRA, T.M. **Freshwater fish distribution**, San Diego: Academic Press. 604 p., 2001.
- BORGES, R. A.; ARRUDA, W.; OLIVEIRA, E. S. F.; CAVASIN, G.M.; SILVA, H.H.G.; SILVA, I.G. Mecanismos da ação larvicida do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais, **Revista de Patologia Tropical**, Vol. 41 (2): 222-232. abr-jun. 2012.
- BOUBOULIS D, ATHANASSOPOULOU F, TYRPENOU A. Experimental treatments with diflubenzuron and deltamethrin of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., infected with the isopod, *Ceratothoa oestroides*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, p.314–7, 2004.
- BURTLE G., MORRISON J., **Dimilin for control of lernaea in golden shiner ponds**, Proceedings Arkansas Academy of Science, Vol. 41, p.17-19, 1987
- CASAL, C.M.V. FishBase. **World Wide Web Electronic Publication**. 2010. Disponível em <<http://www.fishbase.org>> Acessado em 11 de abril de 2012.
- CETESB. **Produtos químicos perigosos**. 2007. Disponível em < <http://www.cetesb.sp.gov.br/gerenciamento-de-riscos/emergencias-quimicas/261-produtos-quimicos-perigosos>> Acessado em 11 de setembro de 2012.
- CHEMTURA CORPORATION, **Ficha de Segurança**, Carechem International Worldwide Coverage, 2006.

CHHABRA, R.S.; THOMPSON, M.; ELWELL, M.R.; AND GERKEN, D.K. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 29, n. 2, p.119-124, 1991.

CHHABRA, R.S.; THOMPSON, M.; ELWELL, M. R.; GERKEN, D.K. Toxicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 10, p. 717-722, 1990.

CONAMA, **Conselho Nacional do Meio Ambiente**, Resolução CONAMA nº 369, de 28 de março de 2006, Publicada no DOU nº 61, de 29 de março, Seção 1, p.150-151, 2006.

CONAMA, **Conselho Nacional do Meio Ambiente**, Resolução CONAMA nº 357, 17 de março de 2005, Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.

CYRINO, J.E.P.; SAMPAIO DE OLIVEIRA, A M.B.M.; COSTA, A.B. **Curso – Introdução à Piscicultura**. Disponível em <<http://projetopacu.com.br/public/paginas/215-apostila-esalq-curso-atualizacao-em-piscicultura.pdf>> Acessado em 29 de agosto de 2012.

DE LA VEJA S., M.Y.; TABCHE, L.M.; GARCIA, C.M. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramírez Dam in Mexico. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, p. 53-62, 1997.

DIETRICH, D.R. e KRIEGER, H.O.; **Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish**, New Jersey: Wiley, p. 341, 2009.

DRAREDJA, B.H.; SOLTANI, N. Effects of diflubenzuron on growth and glutathione in mosquito fish (*Gambusia affinis*). **Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkde Toegep Biol Wet**, v. 66, p. 857-862, 2001.

DUTTA, H. M.; MISQUITA, D.; KHAN, S. The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: a histopathological study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v.51, p.149-56, 2006.

EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; RICE, E.W.; GREENBERG, A.E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. Ed. Maryland: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1082p., 2005.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. **Memoirs of Museum of Comparative Zoology**, v. 53 n.1, p. 1-102. 1917.

ELLGAARD, E.G.; BARBER, J.T.; TIWARI, S.C.; FRIEND, A.L. An analysis of the swimming behaviour of fish exposed to the insect growth regulators, methoprene and diflubenzuron. **American Mosquito Control Association**, v. 39, n. 2, p. 311, 1979.

ERDAL, J.I.; TONEBY, M.; RENNINGEN, K.; WALLACE, C., 1997: **Clinical field trials with diflubenzuron medicated pellet for treatment of Atlantic salmon (*S. salar*) against salmon lice *L. salmonis***. In: Proceedings of 8th International Conference, European Association of Fish Pathologists. p. 14-19, 1997.

ESTEVES, K.E. e ISHIKAWA, C.M. **Características gerais e práticas de manejo em pesqueiros da região metropolitana de São Paulo**. In: ESTEVES, K.E.; SANT'ANNA, C.L. (orgs.) **Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo**. Um estudo da região metropolitana de São Paulo. Rima. p. 240, 2006.

FISHELSON, L.; DELAREA, Y.; GON, O.; Testis structure, spermatogenesis, spermatocytogenesis, and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae, Perciformes). **Anatomy and Embryology**, v. 211, p. 31-46, 2006.

FISHER, S.A.; HALL, L.W. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflubenzuron (Dimilin). **Critical reviews in toxicology**, v.22, n.1, p.45-79, 1992.

FOURNIER, D.; KELLER, L.; PASSERA, L.; ARON, S. Colony sex ratios vary with breeding system but not relatedness asymmetry in the facultatively polygynous ant *Pheidole pallidula*. **Evolution**, v.57, p.1336–1342, 1996.

FOUZ, B.; ESTEVE-GASSENT, M.D.; BARRERA, R.; LARSEN, J.L.; NIELSEN, M.E.; AMARO, C. Field testing of a vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus*. **Design for Aquaculture**, v.45, p.183-189, 2001.

FUJIMOTO, R.Y.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; ONAKA, E.M. **Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos parasitos de piauçu, *Leporinus macrocephalus*. Efeitos paraticida e parâmetros hematológicos.** Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 133, 1999.

GARTENSTEIN S.; QUINNELL R.G., LARKUM A.W.D. **Efeitos de toxicidade do diflubenzuron, cipermetrina e diazinon no desenvolvimento de *Artemia salina* e *Tuberculata heliocidars*,** School of Biological Sciences A08, University of Sydney, NSW 2006.

GÉRY, J. **Characoids of the world.** Neptune City: T.F.H. Publications, 672 p. 1977.

GOMES, A.S.; PALMA J J.C.; SILVA, C.G. Causas e conseqüências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. **Brazilian Journal of Geophysics**, v. 18, p 447-452, 2000

GRAÇA, W.J.I.; C.S. PAVANELLI. **Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes.** Maringá: EDUEM, p. 241, 2007.

GRIER, H.J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSEL, L.D., GRISWOLD, M.D. (Eds.), **The Sertoli Cell.** Florida: Cache River Press. p. 704-739, 1993.

GRIER, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**. V. 21, p. 345-357. 1981.

GRIER H.J., LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F.; DE VLAMING, V.L. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **American Journal of Anatomy**, v. 159, p. 331-45, 1980.

GWO, J.C., CHIU, J.Y., LIN, C.Y., SU, Y., YU, S.L. Spermatozoal ultrastructure of four Sparidae fishes: *Acanthopagrus berda*, *Acanthopagrus australis*, *Lagodon rhomboids* and *Archosargus probatocephus*. **Tissue and Cell**, v. 37. p. 109-115. 2005.

HAHN, N.S.; FUGI, R.; ANDRIAN, I.F. **Trophic ecology of the fish assemblages.** In: THOMAZ, S.M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. (Eds.). The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation. Leiden: Backhuys Publishers, p. 247-269, 2004.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L. (Eds.). **Biomarkers: Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.** Boca Raton: Lewis Publishers, cap. 4, p. 155-209, 1992.

HUET, Marcel. **Tratado de piscicultura.** Madrid: MundiPrensa, 3 ed. p.615, 1983.

KODO FILHO, T. Decontamination of winter flounder (*Pleuronectes americanus*) following chronic exposure to effluent from a pulp and paper mill. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, p.197-201. 2006.

KUBITZA, F.; LOVSHIN, L. L.; ONO, E. A.; SAMPAIO, A. V. **Planejamento da produção de peixes.** 3. ed. rev. ampliada. Jundiaí: F. Kubitza, p.77, 1999.

LAGIANO, V.C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v.147,p. 222–231, 2008.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Editora Manole, 2ª Edição, 281 p., 1993.

LEINO, R.L.; JENSEN, K. M.; ANKLEY, G.T. Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow *Pimephales promelas*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.19, p. 85–98, 2005.

LE GAC, F., LOIR, M. Male reproductive system, fish In: Knobil, E., Neill, J.D. (Ed.), **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press, v. 3, p. 20-30, 1999.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCHUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. **Characidae- Genera Incertae Sedis in Characidae**. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (Orgs.) Check List of the freshwater fishes of the South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 106-169, 2003.

LUVIZOTTO-SANTOS, R.; CORDEIRO, P.J.M.; VIEIRA, E.M. Analysis of diflubenzuron in tilapia filet by HPLC-DAD. **Journal of Chromatographic Science**, Evanston, v. 47: . 785-788, 2009.

LYRA, J.R.M.; FERRAZ, J.M.G.; SILVA, A.P.P.; Acción de inhibidores de la síntesis de la quitina en la reproducción de *Spodoptera litralis* (Boisd.) (Lepdoptera: Noctuidae). **An Soc Entomol Bras** 27: 569-576, 1998.

MABILIA, R.G; SOUZA, S.M.G; SCHIFFINO, L. **Uso do Diflubenzuron na aquacultura no tratamento de ectoparasitoses – Restrições de uso**. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, Passo Fundo, RS, 2004.

MABILIA, R.G. E SOUZA, S.M.G. Efeito do tratamento com Diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 159-163, 2006.

MACEK, J.K. Aquatic Toxicology: Fact or fiction? **Environ Health Perspective**, v. 34, p. 159-163, 1980.

MADUENHO, L.P. **Parâmetros morfo-funcionais de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda ao inseticida Dimilin®**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Zoologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 36 p., 2007.

MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C – Toxicology and Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 265-272, 2008.

MAGALHAES, D.P.; FERRAO FILHO, A.S; A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p. 355-381, 2008.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. **Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi** In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) A bacia do rio Tibagi. cap. 29, p. 551-577. 2002.

MARTINS, F.; SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do Diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 135-138, mar./abr. 2004.

MATTA, S.L.P.; 2002. MATTA, S.L.; VILELA, D.A.; GODINHO, H.P. FRANÇA, L.R. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 970-978, 2002.

MAXIMIANO, A.A.; FERNADES, R.O. NUNES, F.P. ASSIS, M.P.; MATOS, R.V.; BARBOSA, C. G S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicas e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos a saúde humana e ambiental**. Ciência e saúde coletiva, v. 10,n. 2, p.483-491. 2005.

MOJICA, C.A.P. **Morfologia testicular e estrutura da espermatogênese em peixes ornamentais tetra negro, *Gymnocorymbus ternetzi*; tetra amarelo, *Hyphessobrycon bifasciatus* e mato grosso, *Hyphessobrycon eques* (Teleostei, Characiformes)**, Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 95 p., 2007.

MONTOYA, L.N.F. **Efeitos do Thiodan sobre a morfologia do testículo de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) imatura**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 71p. 2008.

MORAIS, A.C.T. **Concentração de metais pesados em peixes teleósteos do rio Piracicaba, Minas Gerais, Brasil**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 88p. 2009.

NEBEKER, A.V.; MCKINNEY, P.; CAIRNS, M.A. Acute and chronic effects of Diflubenzuron (dimilin) on freshwater fish and invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 2, p. 239, 1983.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**, 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 601 p., 2006.

NUNES, L. R. **Toxicidade aguda e efeito subletal do Roundup Transorb® nos testículos de mato grosso *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (TELEOSTEI: CHARACIDAE)** 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C e ROULEAU, C. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environmental Research Section A**, v. 83, p. 286-292, 2000.

ORNE, S.; KEGLEY, S. **Pesticide database**. San Francisco, CA. 2007. Disponível em: <<http://www.pesticideinfo.org>>. Acesso em 10 ago. 2011.

OTTOBONI, M.S. **Substâncias tóxicas no meio ambiente**. Rio de Janeiro: Qualitymark Ed., 1991, p. 342.

PAN - Pesticide Database 2007. **Chemical Toxicity Studies on Aquatic Organisms**. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org/List_EcoChemSpecies.jsp> Acesso em 31 jan. 2011.

PANIZZI, A.R. **O manejo integrado de pragas (MIP): o necessário revigoramento de uma tecnologia que deu certo**. Anais do IV Congresso Brasileiro de Soja, 2006.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; MAGALHÃES, A.R.M. **Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos**. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. (Eds.) Aquicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília, CNPq/MCT, 399 p. 2000.

PEAKALL, D.B. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology and Ecotoxicology News**, v. 1. p. 50-60. 1994.

PEEBUA, P.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P.; SINGHAKAEW S. Histopathological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* in acute and subchronic alachlor exposure. **Journal of Environmental Biology**, v.29, n. 3, p.325-31, 2008.

- POST, G. **Textbook of fish health**. T.F.H. Publications, Neptune City, NJ, 228 p., 1987.
- RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment**. Washington: Taylor & Francis, Second Edition, 1125 p., 1995.
- RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 665 p., 1985.
- SANTOS, D.C.M. **Toxidez aguda do zindo em lambaris *Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 111p. 2009.
- SCHAEFER, C.H.; COLWELL, A.E.; DUPRAS JR., E.F. **The occurrence of pchloroaniline and p-chlorofenylurea from the degradation of diflubenuron and water and fish. California Mosquito and vector control association**. In: Annual Conference, n. 48, p. 84-89. 1980.
- SCHALCH, S.H.C; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Eficácia do diflubenuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences** v. 27, n. 2, p. 297-302, 2005.
- SELVIK A.; HANSEN P. K.; ERVIK, A.; SAMUELSEN, O.B; The stability and persistence of diflubenuron in marine sediments studied under laboratory conditions and the dispersion to the sediment under a fish farm following medication, **Science of the Total Environment**, v. 285, p. 237–245, 2002.
- SILVA FILHO, P. B. **Efeitos do Roundup™ e do Thiodan® em adultos de *Astyanax bimaculatus* (Characidae: Teleostei): Valores de CL50 e morfologia testicular**. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 92p., 2010.
- SISTEMA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA E GENÉTICA (SAEG), UFV, Central de Processamento de Dados, Viçosa-MG, 1999.
- SWANN, L. **A Fish Farmer's Guide to Understanding Water Quality**. Department of Animal Sciences. Illinois-Indiana Sea Grant Program Purdue University. 2008. Disponível em: <<http://aquanics.org/publicat/state/il-in/as-503.htm>> Acessado em jun 2012.
- TAKAYAMA, S; AKAIKE, M; KAWASHIMA, K.; TAKAHASHI, M.; KUOKAWA, K.A collaborative study in Japan on optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorders induced by drugs in rats. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 14, p. 266-292, 1995.
- TANNER, D.K.; MOFFET, M.F. Effects of diflubenuron on the reproductive success of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 1345-1355, 1995.
- USEPA. **Prevention pesticides and toxic substances**. Unites States Environmental Protection Agency, 1997. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/reds/factsheets/0144fact.pdf>> Acesso em: 08 dez de 2011.
- VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER R.; DE ROOIJ D.G. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. **Endocrinology**, v. 133, p. 755–760, 1993.
- VAZ A. J.; AZEVEDO F. A.; CHASIN A.A.M.; **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, p. 1-25, 2004.
- WEITZMAN, S.H.; PALMER, L. The common serpa tetra of aquarists, identified as *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882). **Tropical Fish Hobbyist**, v. 45 p.140-150, 1997.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 478 p., 2006,

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN, R. A. Cell death during development. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, p. 3-0, 2002.