

AMARA MANARINO ANDRADE GOULART

**ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DO INSETICIDA DIMILIN®:
EFEITOS NO COMPORTAMENTO, NA HEMATOLOGIA E NA MORFOLOGIA
TESTICULAR DO LAMBARI *Astyanax bimaculatus***

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

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin

Coorientadora: Andréa Pacheco B. Borges.

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G694a
2019 Goulart, Amara Manarino Andrade, 1979-
Aspectos toxicológicos do inseticida Dimilin® : efeitos no
comportamento, na hematologia e na morfologia testicular do
lambari *Astyanax bimaculatus* / Amara Manarino Andrade
Goulart. – Viçosa, MG, 2019.
85f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 71-85.

1. Peixes - Efeitos dos inseticidas. 2. Toxicologia ambiental.
3. Diflubenzuron (Inseticida). I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 639.969

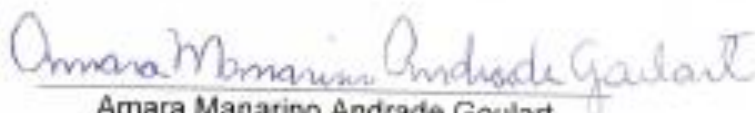
AMARA MANARINO ANDRADE GOULART

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DO INSETICIDA DIMILIN®;
EFEITOS NO COMPORTAMENTO, NA HEMATOLOGIA E NA MORFOLOGIA
TESTICULAR DO LAMBARI *Astyanax bimaculatus*

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

APROVADA: 31 de julho de 2019.

Assentimento:


Amara Manarino Andrade Goulart
Autora


Laércio dos Anjos Benjamin
Orientador

*Dedico este trabalho ao meu marido
Matheus, que sempre respeitou as minhas
decisões e compreendeu minha ausência
física durante este processo, mesmo quando
as decisões tomadas não eram as mais
acertadas... Que me apoiou
incondicionalmente, principalmente nos
momentos de incerteza, muito comuns para
quem tenta trilhar novos caminhos. Sem
você nenhuma conquista valeria a pena.*

AGRADECIMENTOS

Aos animais, parte essencial deste trabalho, que perderam a vida em nome da Ciência.

Aquele que desde sempre foi pra mim uma escola, meu mestre, meu orientador Laércio dos Anjos Benjamin. A quem não há agradecimentos que cheguem. Por sua disponibilidade e paciência em ensinar, pelo respeito ao próximo, aos animais e ao meio ambiente. Um verdadeiro doutor em ser humano. Por nos dar a oportunidade de trabalhar ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito, admiração e gratidão pela sua intensidade, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência, por seu profissionalismo, dedicação à ciência e à formação de pesquisadores, que vão muito além do que o dever impõe. Preocupado não só com a realização do trabalho, mas principalmente com o ser humano e com o planeta. Foi um convívio sempre prazeroso e enriquecedor, fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Serei eternamente grata.

À Profa. Ann Honor Mounteer, que mais uma vez esteve sempre solícita a passar seus conhecimentos, colaborando de forma grandiosa para construção deste trabalho.

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

Agradeço, acima de tudo, aos meus pais, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus, que estiveram presentes em meu coração durante todo esse tempo. Principalmente, por me darem força para superar os obstáculos e imprevistos da vida, mesmo que grandes, dando coragem para continuar nos momentos de alegria que serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e nos de sofrimento, que serviram para um crescimento pessoal único. Obrigada por tudo! Amo vocês!

Ao meu marido Matheus, amor da minha vida, que contribuiu de forma decisiva para que eu pudesse ingressar, cursar e concluir este doutorado. Muita coisa se passou, muita ainda está para vir, mas o que importa é que estaremos sempre juntos para o que der e vier. Agradeço pela companhia diária, pelo ombro amigo, pela confiança, pelas viagens e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa.

À minha querida avó Léa Pimentel Mannarino (*in memoriam*), que com certeza acompanhou do céu toda minha trajetória. O seu sonho de me ver doutora se realizou.

Aos meus irmãos, Tako e Ângelo, e aos meus sobrinhos, Victória, Valeska, Vinícius e Viktor Hugo, que muitas vezes não pude compartilhar os momentos bons nas reuniões de nossa família devido à minha falta de tempo, sei que vocês sempre torceram por mim, mesmo que de longe.

Aos tios e à minha avó Angélica (*in memoriam*), por se orgulharem ao ver mais um passo por mim conquistado. Aos meus primos, que são meus irmãos e também me formam no que sou. Meu muito obrigada por tudo.

Em especial à minha querida prima Elisa, que foi uma parceira em todas as horas, em todos os minutos, em todos os segundos, em todos os momentos, os alegres e os nem tanto, para todas as risadas e para as lágrimas também, para todas as conversas, para todas as zoeiras no Resort, para todas as baladas. Uma prima-amiga para toda vida, me fazendo acreditar que eu posso mais que imagino. Sem o Resort essa jornada não seria a mesma...

Às minhas afilhadas Valeska, Sophia, Manuela e Anallú, este trabalho é com a intenção da construção de um mundo melhor para vocês

E não só à família eu preciso agradecer, mas as pessoas como Dayane, ou simplesmente amiga Day, que foi a pessoa que me olhou nos olhos e me disse que estava tudo bem, que não havia problemas em ser como sou. À Taty, que nesses anos todos de amizade, viu e me ajudou nas mudanças que me transformaram no que sou hoje. Também a Liliane, ou simplesmente Lila, companheira e irmã de alma e de sempre, obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvir minhas bobagens, pelas caronas recheadas de aulas de direção. A minha comadre Cris, por só querer o meu bem e me valorizar como pessoa. À Grazi, que tentou passar adiante a confiança e a vida que acabamos descobrindo juntas, uma na outra. Não podendo esquecer da Tarcy, que chegou por último, mas marcou seu lugar, se tornando o nosso trizal preferido!

As meninas do grupo Crazys Ogras (Renata, Meire, Kília, Lolla, Emiliana), que me incentivaram a lutar e me acolheram em todos os momentos difíceis com ternura sempre que eu precisei.

Aos meus irmãos de estrada, amigos de moto clube, em especial aos integrantes do meu Moto Clube 5ª Coluna e agregados, por toda nossa irmandade, pelos momentos de descontração nas reuniões e de terapia nos Km de asfalto, e aquele

que foi mais que meu médico, meu querido Frederico Faria, mais que meu médico, meu amigo, aquele que me entendeu no momento que eu precisei, meu muito obrigada, principalmente pelo S.O.S.

Aos melhores amigos, irmãos e companheiros que uma pessoa pode ter (Luca, Calebe, Bob, Thiago, Fabola, Bruno, Andréa Handrews, Daniele, Andréa Weitzil entre tantos outros). Obrigada pela amizade incondicional, carinho, conselhos, brincadeiras, broncas, por ouvirem até de madrugada os meus desabafos, pelas horas e horas de bate papo na internet e aqui incluo também meus queridos amigos virtuais, que possuem um lugar especial em minha vida, pelas conversas, confraternizações e momentos de descontração que me ajudaram a ter forças para continuar. Vocês trouxeram alegria, espontaneidade e beleza a minha vida. Obrigada por acreditarem que eu era capaz.

Aqui agradeço também ao grupo de Facebook dedicado aos bolsistas CAPES, pela importante troca de experiências, informações e agonias da vida de pós-graduandos.

Ao querido primo Taquinho, ao Guido e a todo pessoal da Piscicultura da Prata, por todas as vezes que estiveram à disposição para me ajudar com todos os peixes possíveis que eu pude precisar... Sem vocês esse trabalho não teria sido possível!!!

Um agradecimento especial a minha prima Liza Andrade, por ser exemplo de luta, de profissionalismo e de pessoa, mesmo que à distância...

A todos os caroneiros que dedicam seu tempo e seus veículos ajudando e trocando também experiências e auxílio do combustível, em especial ao meu primo Luiz Matta, que tanto me carregou, ao César e a querida Rúbia, que no final do meu último semestre foram providenciais, com toda sua disponibilidade e, principalmente, com os nossos papos, que foram praticamente para mim uma terapia, ajudando não só a fazer com que o caminho fosse mais rápido, mas que a ansiedade fosse menor. Foi muito bom compartilhar momentos com quem estava passando por algo parecido.

A todos, agradeço por toda ajuda em coletas, por estarmos juntos neste projeto e dividirmos momentos de estresse do trabalho. Saibam que eu não conseguiria sem vocês: Luan, Fred, Joana, Letícia, Gabriel, Paloma e, principalmente à Pamela, que não tem como ficar indiferente à sua presença. Um especial obrigada ao Léo, que mesmo de longe me deu uma ajuda nas horas difíceis. Agradeço por preencherem meus dias de laboratório com carinho e alegria, me ajudando ativa ou passivamente neste projeto.

Ao Diego e à Mila, Mermãos Forever S2, eu nunca me esquecerei de vocês.

Ao meu amigo Lucas por ajudar sempre que precisei. Socorro básico na estatística, e também as palavras amigas, os conselhos, o tempo e a atenção a mim dedicados. Isso não tem preço.

À minha ex-professora, e hoje amiga, Ana Teresa, por ter plantado em mim a sementinha de pesquisadora, que só fez crescer. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Obrigada por tudo.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Veterinária da UFV, por compartilharem conhecimentos e experiências, pela amizade e apoio. Ao Cláudio e ao Adão pelo socorro no laboratório e pela amizade de sempre.

À professora Verônica, pelo convívio e pela amizade, pelas palavras de incentivo e carinho, e pelo alto astral sempre presentes para comigo.

À Secretária da Pós-graduação Rosi, sempre um anjo em minha vida, tão solícita em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Veterinária (DVT) pela oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, Código de Financiamento 001.

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.

Ninguém vence sozinho...

Mais uma vez, muito obrigada!

“(...) vocês verão do que é capaz o ser humano quando a ele é dada uma oportunidade ... espero ver esses jovens daqui uns anos virando doutores” (Lula).

“A intermitência do sonho é que nos permite suportar os dias de trabalho” (Pablo Neruda).

“Se você vier me perguntar por onde andei, no tempo em que você sonhava, de olhos abertos, lhe direi: Amigo, eu me desesperava...” (Belchior).

RESUMO

GOULART, Amara Manarino Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Aspectos toxicológicos do inseticida Dimilin®: Efeitos no comportamento, na hematologia e na morfologia testicular do lambari *Astyanax bimaculatus*.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadora: Andréa Pacheco Batista Borges.

Para investigar impactos dos agrotóxicos em organismos vivos, são utilizados testes padronizados de toxicidade que ajudam prevenir ocorrências de alterações de alta relevância ecológica nessas populações. Com isso, objetivou-se determinar a CL₅₀, analisar as alterações hematológicas e morfológicas, e observar aspectos comportamentais do lambari *Astyanax bimaculatus* provocadas pela exposição ao Dimilin®, além de avaliar a possível capacidade de recuperação após a transferência dos peixes para aquários com água limpa. Para a CL₅₀-48h, os peixes foram divididos em grupo controle, sem tóxico, e grupos com concentrações de 5, 15, 45, 135 e 405 mg/L do tóxico com três repetições por concentração, contendo cinco peixes cada. O teste de toxicidade de 96h, utilizou grupo controle e três grupos com concentrações de 3, 6 e 12 mg/L de Dimilin®. Após exposição aguda, foi avaliada a capacidade de recuperação a partir da transferência dos peixes para aquários com água sem contaminante. Testículos e sangue de seis animais de cada grupo foram coletados 96h após exposição ao tóxico e sete dias após a transferência de ambientes e processados para estudos histológicos e hematológicos de rotina. A CL₅₀-48h foi de 97,1mg/L, com intervalo de confiança de 63,8 a 147,6 mg/L ($P < 0,05$) ($\pm 22,4^\circ\text{C}$). O parâmetro nado lento foi o evento de comportamento mais observado para todos os grupos. Entre os comportamentos relacionados ao estresse, pulando, nado errático, deitado no fundo e nado na superfície só foram observados nos grupos expostos ao Dimilin®. As alterações observadas nas taxas de hematócrito mostram condição anêmica dos peixes. Observou-se diminuição de neutrófilos e eosinófilos e aumento de linfócitos e monócitos nos grupos expostos quando comparados ao grupo controle. A avaliação das respostas metabólicas ao se comparar os resultados do hematócrito do *A. bimaculatus* no período de desintoxicação de sete dias com a exposição por 96h, revelou que estes foram recuperados, ocorrendo a desintoxicação dos organismos. Observou-se diminuição no diâmetro médio das células espermatogênicas no experimento de 96h, com diferença ($P < 0,05$) para os núcleos

de espermatogônia B, espermatócito I e espermatócito II, sendo esta mais marcante entre controle e maior concentração (12 mg/L). Foram observadas diminuição no diâmetro médio com diferenças ($P < 0,05$), para cistos de espermatócito I, cistos de espermatócito II e cistos de espermatíde, sendo também a diferença mais marcante entre o controle e a concentração 12 mg/L. Quando comparados o tempo de exposição de 96h de Dimilin® com o tempo de desintoxicação de sete dias, os diâmetros médios dos núcleos de espermatócitos I e II de *A. bimaculatus* apresentaram aumento com diferenças ($P < 0,05$) no período de sete dias, quando comparados dentro das mesmas concentrações nos diferentes tempos, assinalando uma melhora nos valores dos núcleos com sete dias, indicando recuperação nos parâmetros avaliados. O *A. bimaculatus* pode ser classificado como espécie sensível ao Dimilin®, uma vez que a exposição ao produto nas concentrações utilizadas alterou o padrão tecidual dos testículos. O período de desintoxicação sete dias em água limpa após exposição aguda ao Dimilin® em concentrações abaixo de 12mg/L foi suficiente para recuperação das alterações hematológicas e testiculares causadas no lambari, demonstrando assim a capacidade de recuperação, indicando a plasticidade que os peixes apresentam.

Palavras-chave: Peixes. Efeitos dos inseticidas. Toxicologia ambiental. Diflubenzuron. Inseticida.

ABSTRACT

GOULART, Amara Manarino Andrade, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Toxicological aspects of Dimilin® insecticide: Effects on behavior, hematology and testicular morphology of lambari *Astyanax bimaculatus*.** Advisor: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisor: Andréa Pacheco Batista Borges.

To investigate the impacts of pesticides on living organisms, standardized toxicity tests are applied that help prevent occurrences of highly ecologically relevant changes in these populations. Thus, the objective was to determine the CL₅₀, analyze the hematological and morphological changes, and observe behavioral aspects of lambari *Astyanax bimaculatus* caused by exposure to Dimilin®, in addition to evaluating the possible recovery capacity after transferring the fish to aquariums with clean water. For CL₅₀-48h, fish were divided into a control group, without contact with the toxic pesticide, and groups with concentrations of 5, 15, 45, 135 and 405 mg/L of toxic with three repetitions per concentration, containing five fish each. The 96h toxicity test used the control group and three other groups with concentrations of 3, 6 and 12 mg/L of Dimilin®. After acute exposure, the recoverability of the transferred fish to aquariums with clean water was evaluated. Testicles and blood from six animals in each group were collected 96h after exposure to the toxicant and seven days after the transference to clean environments and histological and hematological studies processed. The LC₅₀-48h was 97,1mg/L, with a confidence interval of 63,8 to 147,6 mg/L ($P < 0,05$) ($\pm 22,4^\circ\text{C}$). The slow swimming parameter was the most observed behavior event for all groups. Among the stress-related behaviors, jumping, erratic swimming, lying on the bottom and swimming on the surface were only observed in the groups exposed to Dimilin®. The observed changes in hematocrit rates show anemic condition of the fish. A decrease in neutrophils and eosinophils and an increase in lymphocytes and monocytes were observed in the exposed groups when compared to the control group. The evaluation of metabolic responses when comparing the hematocrit results of *A. bimaculatus* in the seven-day detoxification period with exposure for 96 hours, revealed that they recovered, showing the detoxification of the organisms. There was a decrease in the mean diameter of spermatogenic cells in the 96h experiment, with a difference ($P < 0,05$) for the nuclei of spermatogonia B, spermatocyte I and spermatocyte II, which higher significance between the control group and the higher concentration (12 mg/L). A decrease in mean diameter with differences ($P < 0,05$) was

observed for spermatocyte I cysts, spermatocyte II cysts and spermatid cysts, with the most striking difference also being between the control and the 12 mg/L concentration groups. When comparing the 96h exposure time of Dimilin® with the detoxification time of seven days, the mean diameters of the nuclei of spermatocytes I and II of *A. bimaculatus* showed an increase with differences ($P < 0,05$) in the period of seven days, when compared within the same concentrations at different times, indicating an improvement in the values of the nuclei after seven days, indicating recovery in the parameters evaluated. *A. bimaculatus* can be classified as a species sensitive to Dimilin®, since exposure to the product at the concentrations used changed the tissue pattern of the testicles. The detoxification period of seven days in clean water after acute exposure to Dimilin® at concentrations below 12mg/L was sufficient to recover the hematological and testicular changes caused in lambari, thus demonstrating the ability to recover, indicating the recoverability that fish have.

Keywords: Fish. Effects of insecticides. Environmental toxicology. Diflubenzuron. Insecticide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Lambari, <i>A. bimaculatus</i>	22
Figura 2 – Os testículos do lambari <i>A. bimaculatus</i>	26
Figura 3 – Teste de toxicidade aguda para a determinação da CL ₅₀	39
Quadro 1 – Categorias de comportamentos a serem analisados.....	42
Figura 4 – Medidas de comprimento obtidas com auxílio de paquímetro.....	44
Figura 5 – Peso corporal em balança de precisão.....	44
Figura 6 – Kit Labcon Test.....	46
Figura 7 – Sangue coletado por punção cardíaca.....	48
Figura 8 – Organização estrutural do testículo. Em destaque: SgA. Espermatogônia A ou primária; SgB. Espermatogônia B ou secundária; L. Luz do túbulo com espermatozoides e secreção tubular; Se. Célula de Sertoli delimitando um cisto; Spc I. Cisto de espermatócito primário; Spc II. Cisto de espermatócito secundário; Alb. Albugínea testicular. HE. Aumento: 100X. Encartes: 400X.....	49
Figura 9 – Morfometria dos cistos de espermatócitos e dos núcleos espermatogônias. A. Diâmetro de cistos de espermatócitos I; B. Diâmetro de cistos de espermatócitos II; C. Diâmetro do núcleo espermatogônia A; D. Diâmetro do núcleo de espermatogônia B. 400X.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ecotoxicologia do produto comercial DFB	17
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do DFB.....	18
Tabela 3 – Comprimento total (mm), comprimento padrão (mm), peso corporal (g) e fator de condição (g/cm) para <i>A. bimaculatus</i> em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.....	45
Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos da água para <i>A. bimaculatus</i> em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.....	52
Tabela 5 – Análise dos parâmetros comportamentais do <i>A. bimaculatus</i> expostos ao Dimilin® por 96h.....	54
Tabela 6 – Valores de HCT e ocorrência de hemólise para <i>Astyanax bimaculatus</i> após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.....	56
Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e trombócitos para <i>A. bimaculatus</i> em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.....	60
Tabela 8 – Diâmetro médio (µm) de núcleos de espermatogônias (Spg) A e B e de núcleos de espermatócitos (Spc) I e II para <i>A. bimaculatus</i> em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.....	63
Tabela 9 – Diâmetro médio (µm) de cistos de espermatócito (Spc) I e II, cistos de espermatídes (Spt), para <i>A. bimaculatus</i> em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Dimilin®.....	17
2.2 O lambari.....	21
2.3 Morfologia testicular e espermatogênese em lambari.....	24
2.4 Avaliação ecotoxicológica.....	27
2.5 Hematologia em peixes.....	30
2.6 Recuperação de peixes após exposição a agrotóxicos.....	31
2.7 Avaliação comportamental.....	33
3. OBJETIVOS.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Animais.....	38
4.2 Agrotóxico.....	39
4.3 Determinação da CL ₅₀ -48h do Dimilin® para <i>A. bimaculatus</i>	39
4.4 Aquários experimentais e aplicação do inseticida: exposição por 96h.....	40
4.5 Transferência para água livre do tóxico: período de desintoxicação.....	41
4.6 Avaliação comportamental.....	41
4.7 Obtenção de dados biométricos.....	43
4.8 Análise de água.....	46
4.9 Coleta de amostras.....	47
4.10 Hematologia.....	47
4.11 Análise histológica.....	49
4.12 Análise estatística.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Determinação da CL ₅₀ -48h do Dimilin® para <i>Astyanax bimaculatus</i>	51
5.2 Análise de água.....	51
5.3 Análise comportamental.....	53
5.4 Análises hematológicas.....	55
5.5 Análises histológicas.....	62
6. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são os contaminantes aquáticos mais relevantes. Eles são preparados para dar fim a alguma forma de vida, entretanto, são letais para espécies não alvo. No ambiente aquático, eles acarretam impactos em múltiplos níveis, incluindo moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades (ALBINATI *et al.*, 2009). Para se avaliar os efeitos adversos de um agente químico no organismo vivo, são utilizados testes padronizados de toxicidade que ajudam a prevenir a ocorrência de alterações de alta relevância ecológica nessas populações.

O Dimilin® é um agrotóxico muito usados no controle de artrópodes, pois atua como um potente regulador de crescimento, prejudicando a síntese de quitina durante a fase de muda de estádios imaturos. As pisciculturas do Rio Grande do Sul, o uso desse medicamento no tratamento de lerneose é muito elevado (MABÍLIA *et al.*, 2004) e poucos são os dados sobre o efeito do Dimilin® nos peixes neotropicais.

Os lambaris (*Astyanax bimaculatus*) são peixes que podem ser encontrados sempre em cardumes em cabeceiras de riachos, rios e lagos, e realizam migrações curtas para sua reprodução nos períodos de cheia, variando conforme o *habitat* e a espécie, estendendo-se de setembro a março (BEIRÃO *et al.*, 2015). Desmatamento ciliar, destruição de lagoas marginais e leitos de riachos por projetos agrícolas, uso de agrotóxicos em lavouras e plantações próximas a rios e lagos, constituem ameaça em várias regiões, por alterar diretamente a biologia reprodutiva desta e de outras espécies (CEMIG/CETEC, 2000) e, assim, fatores como esse interferem diretamente na dinâmica da população desses peixes.

Pode-se avaliar o efeito do agrotóxico em órgãos ou tecidos específicos por meio de parâmetros hematológicos, morfológicos e histológicos. Devido à carência de dados sobre os efeitos do Dimilin® para peixes neotropicais, propõe-se avaliar os possíveis efeitos desse inseticida no lambari (*Astyanax bimaculatus*).

O lambari é um bom instrumento de pesquisa por ser um peixe com grande distribuição nacional, importante na pesca de subsistência, apresentar resistência a diferentes ambientes inclusive ao confinamento, podendo se constituir em um possível bioindicador de contaminação ambiental, particularmente o ambiente aquático.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dimilin®

O diflubenzuron (cujo nome comercial é Dimilin®) é um inseticida que pertence ao grupo da benzoilfenilureia, de nome químico N-[(4-clorofenil) amino] carbonil]-,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 0,1mg/L em temperatura de 20 a 25°C. Por ser considerado de baixa toxicidade, o Dimilin® pertence à classe toxicológica IV (CHEMTURA, 2006).

O diflubenzuron (DFB) é potente regulador de crescimento de artrópodes, pois interfere na síntese de quitina durante a fase de muda de estádios imaturos. Em pisciculturas no estado do Rio Grande do Sul, o percentual de uso de medicamentos no tratamento de lerneose é muito elevado (MABÍLIA *et al.*, 2004). As tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, aspectos ecotoxicológicos e propriedades físico-químicas para benzoilfenilureias comerciais (SUN *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Ecotoxicologia do produto comercial DFB.

ECOTOXICOLOGIA DO DIFLUBENZURON	VALOR* E CLASSIFICAÇÃO
DL ₅₀ oral de mamíferos (mg/kg) (rato)	4640 (>2000, baixa)
Aves DL ₅₀ (mg/kg) Codorniz (<i>Colinus virginianus</i>)	5000 (>2000, baixa)
Peixe CL ₅₀ (96 h) (mg/L) Truta-arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	0,13 (0,1-100 moderada)
Invertebrados aquáticos CE ₅₀ (48 h) (mg/L) (<i>Daphnia magna</i>)	0,0026 (<0,1 alta)
Crustáceos aquáticos CL ₅₀ (96 h) (mg/L) (<i>Americamysis bahia</i>)	0,0021 (<0,1 alta)
Minhocas CL ₅₀ (14 dias) (mg/kg) (<i>Eisenia fetida</i>)	500 (10-1000, moderada)

*Valor referente a toxicidade do diflubezuron em cada experimento relativo (DL₅₀, CL₅₀, CE₅₀).

Fonte: SUN *et al.* (2015).

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do DFB.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DFB	VALORES
Solubilidade em água	0,1mg/L - 20 a 25°C
Coeficiente de partição (k)	3500ppm
Mobilidade e lixiviabilidade - solos/água	7 dias - 8 dias
Meia-vida solo/água	2 a 6 dias - 1 a 7 dias
Persistência na superfície das folhas	Cerca de um ano
Biodegradação aeróbias / anaeróbias	2 a 78 dias
Rota de biodegradação	Clivagem por esterases
Detoxificação - oxidação e hidrólise	Enzimas carboxilesterases e fosfotriesterases
Parâmetros de ampliação ecológica	19ppm/peixe
Índice de biodegradabilidade	4,99 ppm/peixe
Ponto de fusão	227,6°C
Degradação no solo DT50	3 dias (<30 não persistente)
Fotólise aquosa DT50	80 dias (>30 estável)
Hidrólise aquosa DT50	96 dias (30–100, moderadamente persistente)

Fonte: SUN *et al.* (2015).

Embora seja considerada uma droga de baixa toxicidade para os seres humanos, de acordo com a classe toxicológica, pela CHEMTURA (2006), seu uso requer cuidado, não devendo ser manuseado ou aplicado o produto sem os equipamentos de proteção individual recomendados, e não se utilizando aqueles equipamentos que estejam 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).

O Dimilin® 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; porém, é persistente na superfície das folhas, permanecendo na serapilheira por cerca de um ano (MADUENHO; MARTINEZ, 2008). A persistência do Dimilin® é mais baixa em condições de pH elevado (10) e temperatura de 38°C; a

luz solar direta, aparentemente não exerce nenhum efeito nessa persistência. Esses valores simulados dificilmente se aplicam às condições ambientais naturais (CHEMTURA, 2006).

Os parâmetros de ampliação ecológica (*parameters of ecological magnification*) (EMF) e de índice de biodegradabilidade (BI) (ou partes por milhão de radioatividade polar/partes por milhão de radioatividade não polar) estudados por ZAIDI; FARINE; SOLTANI (2013) mostram que os valores de EMF para o composto Dimilin® para peixe foram de 19 ppm. Os valores de BI para peixe foram, 4,99 ppm. Os dados sugerem as vias de degradação do Dimilin® como indicado pela radiomarcagem em ambas as metades da molécula. Os principais produtos de degradação encontrados no rótulo do Dimilin® foram a 2,6-difluorobenzamida e o ácido 2,6-difluorobenzóico (que foram identificados por cromatografia das respectivas áreas radiativas com padrões conhecidos) (ZAIDI; FARINE; SOLTANI, 2013).

Apenas pequenos vestígios de outros produtos de degradação foram encontrados neste rótulo. A estabilidade também foi confirmada em experimentos com peixes, em um ecossistema aquático modelo fechado (LU; METCALF, 1975) por um período de 3 dias. O alto nível de radioatividade polar no peixe (50%) deve-se presumivelmente aos conjugados do ácido 2,6-di-fluorobenzóico (ZAIDI; FARINE; SOLTANI, 2013).

De acordo com SCHAEFER *et al.* (1979) o Dimilin® é acumulado a partir do seu contato diluído em água nos tecidos de peixe em níveis até 80 vezes maior que o permitido dentro 24 horas quando os peixes são expostos a concentrações de 0,1 mg/kg. Dentro do intervalo de concentração, a quantidade acumulada em uma exposição de 24 horas é proporcional à concentração. Após 24 a 48 horas de exposição, os peixes degradam e eliminam o Dimilin® e os produtos excretórios não são nem o composto parental nem clorofenilureia. A quantidade de Dimilin® restante nos tecidos de peixe com o tempo depende da redução da concentração de resíduos na água; no entanto, o potencial de degradação e a eliminação é muito grande.

Para pragas de cultivo agrícola, Dimilin® deve ser preparado em diluição com água, formando uma calda com volume suficiente para dar cobertura uniforme. A pulverização de aplicação pode variar de acordo com a cultura, usando a pulverização via terrestre em modo costal ou tratorizado. A pulverização também pode ser feita por

via aérea. No cultivo de algodão, a dosagem utilizada em forma de calda é de 60 L/ha na quantidade de 150L/ha de calda, com intervalos de 10 a 28 dias, para a praga curuquerê (*Alabama argillacea*). O tratamento deve ser iniciado antes que o nível de desfolha ou a contagem de lagartas atinja os níveis preconizados nas tabelas tradicionais. No cultivo de citros, a dosagem utilizada em forma de calda é de 500 L/ha na quantidade de 2000L de calda/ha, com intervalos de 30 dias, para combater o bicho furão (*Ecdyolopha aurantiana*). O tratamento deve ser efetuado no início da infestação antes que a larva penetre no fruto (BRASIL, 2018).

Segundo STEVENS; PEREIRA; KOEHLER, (2019), o Dimilin® 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 (KUMAR; BABU; EVANS, 2019), e lagarta elasmô ou broca-do-colo (*Elasmopalpus lignosellus*) dos cultivos de milho (KAGAMI, 2019).

Estudo feito com larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas ao diflubenzuron indica a viabilidade do uso do Dimilin® em função da alta mortalidade provocada no inseto (AL-AZAB; SHAALAN, 2018). Doses de 0,2 e 0,4 ppm, obtendo índices de mortalidade de até 96% das larvas de mosquito (GAUTAM *et al.*, 2018).

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 para combates de ectoparasitas é do Dimilin®), sendo utilizados também as avermectinas (19,04%), produtos organofosforados (9,52%), além de outros (38,19%). O Dimilin® é usado no tratamento de piolhos em kinguios na proporção de uma colher de sopa para cada 240 L de água. O medicamento deve permanecer na água por 14 dias e ser repetido por mais 14 dias, não sendo recomendada a troca de água entre tratamentos (TANG *et al.*, 2019). BOUBOULIS; ATHANASSOPOULOU; TYRPENOU (2004) usaram em seus experimentos Dimilin® diluído em óleo de fígado de bacalhau, e adicionado a ração comercial na concentração de 2000 mg/kg de ração. Dimilin® foi também eficaz no tratamento de *Salmo salar* infectado por piolhos, na dose de 3 mg/kg/dia, durante 14 dias (ERDAL *et al.*, 1997). O Dimilin® tem sido frequentemente usado em piscicultura para combater ectoparasitas em peixes com eficácia nas concentrações que variam entre 0,5 a 2 mg/L (FUJIMOTO *et al.*, 1999; KUBITZA *et al.*, 1999; SCHALCH *et al.*,

2005). A eficácia do Dimilin® também foi avaliada por meio de banhos terapêuticos para o controle de *Dolops carvalhoi* em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) naturalmente infestados (LUVIZOTTO-SANTOS *et al.*, 2018). O Dimilin® foi aplicado três vezes na concentração de 2,0 mg/L na água, na forma de banhos com 30 minutos de duração e intervalo de 24 h. Na avaliação parasitológica foi constatada a eficácia de 97,2% do Dimilin® (SCHALCH *et al.*, 2005).

Na pecuária, para o combate de carrapatos em bovinos foi utilizado o tratamento com sal composto com Dimilin® (JUNQUERA *et al.*, 2019). O sal contendo Dimilin® a 3% foi fornecido diariamente e *ad libitum*, sendo o consumo médio de 70 g/dia por animal, apresentando eficácia entre 98,83% e 99,20% (DELL'PORTO *et al.*, 2012). Dimilin® é administrado também em sal mineral para se combater a mosca do chifre (*Haematobia irritans*) com 15 g do princípio ativo sendo adicionado em 30 g de sal (CAMPOS *et al.*, 2008).

Embora esses inseticidas sejam de extrema importância, tem havido uma crescente preocupação entre os ambientalistas (ABE *et al.*, 2019), uma vez que podem oferecer riscos a artrópodes não-alvo e ecologicamente importantes, causando reduções de populações, às vezes irreversíveis, e com isso, afetando todo um ecossistema (CASTRO *et al.*, 2012; GARTENSTEIN; QUINNELL; LARKUM, 2006).

Analisar 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 (ABE *et al.*, 2019). O estudo de parasitas que causam prejuízos a piscicultura se torna crescente para que se evitem mortalidades e doenças do plantel (MENDES JUNIOR *et al.*, 2019).

2.2. O lambari

O lambari *Astyanax bimaculatus* (LINNAEUS, 1758), conhecido em algumas regiões por lambari, lambari-guaçu, mojarra, piaba. Revisões recentes colocam o gênero em “*Incertae sedis*”. A antiga subfamília Tetragonopterinae continha 88 gêneros e 620 espécies, sendo que 86 espécies pertencem ao gênero *Astyanax* (LIMA *et al.*, 2003), possuindo ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado do

sudoeste dos Estados Unidos até a Bacia do rio da Prata, no Uruguai (MOREIRA FILHO, 1989).

O *Astyanax bimaculatus* é considerado peixe de pequeno porte, podendo medir até cerca de 20 cm de comprimento e seu peso pode chegar até 40 g. Possui nadadeiras amarelas, escamas prateadas, mancha umeral ovalada e pedúnculo caudal com mancha alongada que se prolonga até a ponta dos raios caudais medianos (Figura 1) (YOSHIDA *et al.*, 2018).

Figura 1 – Lambari, *A. bimaculatus* (GOULART, 2019).



A biologia reprodutiva do lambari pode ser prejudicada pelo desmatamento ciliar, poluição industrial e doméstica, e destruição de várzeas e lagoas marginais por projetos agrícolas que também constituem ameaça em várias regiões (CEMIG/CETEC, 2000). Esses fatores interferem na dinâmica da população desses peixes. Nas construções de novas barragens o *A. bimaculatus* é uma das poucas espécies capazes de sobreviver nessas condições.

Os *A. bimaculatus* são considerados onívoros, se alimentando de algas, vegetais, sementes, larvas e insetos adultos (CEMIG/CETEC, 2000; VITULE; ARANHA, 2002). Em estudo conduzido com o lambari da espécie *Astyanax janeiroensis*, verificaram-se que os principais hábitos alimentares se baseavam em algas, microcrustáceos, pequenos invertebrados e esporos vegetais (SANTIN *et al.*, 2005). Portanto, os lambaris são de extrema importância em diversos habitats como consumidores secundários. Além disso, são peixes de interesse alimentar para outros peixes consumidores terciários (YOSHIDA *et al.*, 2018).

A ecologia alimentar de uma determinada espécie faz parte e interfere diretamente na dinâmica de sua população, sendo primordial para a conservação do ecossistema como um todo (VITULE; ARANHA, 2002). Os lambaris são de extrema importância em diversos habitats por equilibrarem o ecossistema e a cadeia alimentar, constituindo-se em fonte de alimentos para peixes maiores, carnívoras e aves.

O *A. bimaculatus*, como a maioria dos peixes teleósteos, normalmente forma cardumes de ambos os sexos. Esses cardumes podem variar com o tamanho dos peixes, com peixes menores apresentando tendência de formar cardumes maiores e ficarem mais na superfície. Peixes maiores, provavelmente com estágio de maturação sexual mais avançado, tendem a formar grupos menores, comportamento esse inato e hereditário (ANGERMEIER; KARR, 1983).

Embora sejam animais sociais, podem apresentar comportamento agonista, especialmente quando acasalam, e durante o estabelecimento de hierarquias de dominância que ocorrem dentro e entre os sexos. Por possuir comportamento pacífico e gregário, esses peixes devem ser mantidos em cardumes de pelo menos meia dúzia de espécimes ou mais para que assim mostrem seu comportamento natural. Pode ser mantido em aquário comunitário com peixes de pequeno a médio porte igualmente pacíficos (LAWRENCE, 2007). É um peixe de hábito tipicamente diurno, mostrando os maiores níveis de atividade durante as primeiras horas da manhã. Dorme frequentemente, embora não exclusivamente, durante a noite, e possui grande adaptação às mudanças estacionais (LOWE-MCCONNELL, 1975).

Esse padrão circadiano de atividade influi nos processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais do animal, padrão esse que deve ser levado em consideração nos biotérios de criação. Com relação à alimentação, estudos sobre a dieta de peixes tropicais de água doce mostram que, de maneira geral, os peixes apresentam uma considerável plasticidade trófica (ABELHA; AGOSTINHO; GOULART, 2001), sendo quase sempre “polimorfismo trófico, com surgimento de morfotipos, que são espécimes de uma mesma espécie que diferem em habitat, dieta e morfologia”, (ABELHA *et al.*, 2001, p.428), ou seja, mudam sua dieta de acordo com variações espaciais e temporais em função da disponibilidade dos itens alimentares.

O *A. bimaculatus* é uma espécie com potencial para a piscicultura e o gênero *Astyanax* tem recebido atenção especial devido sua rusticidade, rápido crescimento,

hábito alimentar onívoro (SAINT-PAUL, 2017), carne saborosa e também por ser utilizado como isca viva na pesca (PAIVA *et al.*, 2006).

Assim, devido à diversidade de ambientes em que se encontra a espécie, e também às suas características reprodutivas, que representam o comportamento de grande parte dos teleósteos, o estudo da espermatogênese da espécie em exposição aos agrotóxicos pode ser representativo dos peixes neotropicais de pequeno porte. Isso os torna um ótimo modelo experimental, além da facilidade de obtenção e de manutenção em condições laboratoriais, por ser uma espécie nativa de grande interesse comercial e muito abundante nos rios de regiões brasileiras, inclusive na Zona da Mata Mineira.

2.3. Morfologia testicular e espermatogênese em lambari

Os testículos do lambari são pares e alongados, de superfície lisa e apresentam tamanho aproximado entre o lado direito e o esquerdo. Estão localizados na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestivo, ventralmente ao mesonefro e ventrolateralmente ao longo da bexiga gasosa, encontrando-se presos à parede abdominal e à referida bexiga gasosa pelo mesórquio. Cada testículo apresenta uma extremidade cranial afilada, uma parte média de forma triangular e uma porção caudal que se afila gradualmente até unir-se à do outro testículo, formando um ducto único que desemboca na papila urogenital (NOMURA, 1975; PELIZARO *et al.*, 1981).

Nos lambaris, a espermatogênese desenvolve-se em cistos que se formam quando células de Sertoli e uma espermatogônia primária se associam. Durante este processo, a espermatogônia primária é circundada por células de Sertoli, que neste estágio são pouco desenvolvidas (PUDNEY, 1995). A espermatogônia divide-se e origina espermatogônias secundárias que, depois de várias divisões mitóticas, diferenciam-se em espermatócitos primários. Eles entram em divisão meiótica formando os espermatócitos secundários, que por sua vez passam pela segunda divisão meiótica para produzir células haploides, as espermatídes (GRIER, 1993). Estas últimas passam pela fase espermiogênica, caracterizada por alterações morfológicas marcantes, principalmente relacionadas com a condensação nuclear e a formação da peça intermediária e flagelo, originando os espermatozoides, que são

células altamente especializadas e equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (MIURA, 1999).

As espermatogônias primárias são as maiores células germinativas das espécies de teleósteos, apresentando um núcleo grande e claro, com pouca heterocromatina, contendo um ou dois nucléolos bastante evidentes (MIURA, 1999). Após sucessivas divisões, a partir da espermatogônia primária, o número de espermatogônias secundárias por cisto aumenta geometricamente, enquanto o diâmetro nuclear das mesmas sofre redução gradual (BILLARD, 1969).

A análise histológica do testículo do lambari mostra que esses apresentam-se envolvidos por cápsula de tecido conjuntivo da qual partem septos fibrosos para o seu interior delimitando túbulos seminíferos (NOMURA, 1975; PELIZARO *et al.*, 1981). O interstício do testículo de teleósteos apresenta capilares sanguíneos e fibras nervosas difusas, sendo desprovido de sistema linfático. Nesta região do testículo estão presentes, além das células de Leydig, fibroblastos típicos (SANTOS, 2019).

A espermatogênese desenvolve-se em cistos que se formam quando células de Sertoli e uma espermatogônia primária se associam (GRIER; URIBE, 2009). Durante este processo, a espermatogônia primária é circundada por células de *Sertoli*, que neste estágio são pouco desenvolvidas (PUDNEY, 1995).

Durante a espermição, as células de Sertoli que forma a parede dos cistos se rompem para liberar os espermatozoides num lume cujo espaço aumenta gradualmente ao longo do período reprodutivo (GRIER *et al.*, 1980; GRIER, 1981; PUDNEY, 1995).

Na maioria das espécies de teleósteos, os ciclos reprodutivos ocorrem em função de variações das condições ambientais, sendo a temperatura e o fotoperíodo (CHEHADE; CASSEL; BORELLA, 2015) considerados como os dois mais potentes moduladores da atividade reprodutiva (BILLARD, 1986; SHIMIZU, 2003). Devido os peixes serem animais pecilotérmicos (da qual a temperatura normalmente está ligeiramente acima da temperatura ambiente), supostamente faz com que o período dos eventos espermatogênicos varie relacionados com a temperatura, sendo em temperaturas mais elevadas mais rápida (LACERDA, 2008; BILLARD, 1986; FRANÇA *et al.*, 2005).

Figura 2 – Os testículos do lambari *A. bimaculatus* (GOULART, 2019).



Nos teleósteos, a espermatogênese desenvolve-se em cistos que se formam quando células de Sertoli e uma espermatogônia primária se associam (URIBE; GRIER; MEJÍA-ROA, 2014). Durante este processo, a espermatogônia primária é circundada por células de Sertoli, que neste estágio são pouco desenvolvidas (ANDRADE *et al.*, 2004; PUDNEY, 1995).

Em teleósteos, o processo espermatogênico pode ocorrer de duas maneiras conforme a distribuição das espermatogônias ao longo do túbulo seminífero: tipo espermatogonial irrestrito, com as espermatogônias distribuídas ao longo do túbulo, e tipo espermatogonial restrito, com as espermatogônias restritas à porção distal do túbulo seminífero, próximas da túnica albugínea (GRIER *et al.*, 1980; GRIER, 1981; SOUTO *et al.*, 2017).

O processo espermatogênico de teleósteo assemelha-se ao de outros vertebrados. Através dos hormônios gonadotróficos hipofisários, o FSH e o hormônio luteinizante (LH), células *Leydig* esteroidogênicas intersticiais e células de Sertoli expressam receptores para FSH e LH que são integrados aos circuitos reguladores endócrinos que governam a puberdade e o funcionamento adulto do testículo (GARCÍA-LOPEZ *et al.*, 2008). A sobrevivência e o desenvolvimento de células germinativas *in vivo* dependem da sua interação íntima e contínua com células de Sertoli, de modo que o número de células de Sertoli limita a capacidade espermatogênica de um testículo (FRANÇA *et al.*, 2005).

2.4. Avaliação ecotoxicológica

Quando ecossistemas aquáticos estão poluídos com contaminantes orgânicos e inorgânicos, os peixes serão quase que inevitavelmente contaminados. A avaliação ecotoxicológica requer conhecimento das fontes de emissão, difusão, transformação e destino dos poluentes no ecossistema e, segundo MADUENHO; MARTINEZ (2008), é importante conhecer os riscos potenciais desses poluentes para a biota, incluindo o homem. As técnicas que evidenciam respostas em níveis subcelulares de organização biológica são consideradas preventivas, sendo os biomarcadores uma das abordagens mais promissoras (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Dessa forma, a ligação dos biomarcadores entre exposição e efeito contribui para a definição da relação dose-resposta (DEBORD *et al.*, 2015).

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 (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008), incluindo letalidade (mortalidade) e efeitos subletais (alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas patológicas, alterações bioquímicas fisiológicas e comportamentais) (MONTANHA; PIMPÃO, 2012). Segundo SANTOS (2005) o estudo de indicadores que consigam diagnosticar mais rapidamente alterações promovidas pela ação desses produtos no ambiente, pode constituir ferramenta importante.

Os biomarcadores de recuperação são capazes de significar indicadores ambientais ao qualificar os riscos ecotoxicológicos dos agrotóxicos para organismos não-alvo (LUSHCHAK *et al.*, 2018). Mesmo quando estes agrotóxicos são aplicados a áreas locais, eles podem ser lavados ou lixiviados e levados embora por águas de irrigação e enxurradas de chuvas para lençóis freáticos, para rios e represas, podendo ser altamente tóxico para populações aquáticas como peixes e outros organismos, e até mesmo humanos (DUARTE; KAKINAMI, 2018). A determinação da desintoxicação aos compostos antropogênicos e pesticidas é essencial para a avaliação da saúde ambiental nesses organismos não-alvo (YHASMINE, 2013).

Estudos com diferentes espécies de peixes, crustáceos e organismos aquáticos para a determinação da concentração letal média em 48h (CL₅₀) de Dimilin® indicam

que um dos metabólitos do Dimilin®, 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; HALL, 1992). De acordo com CHEMTURA (2006) a toxicidade aguda para crustáceos a CL₅₀ (48h) foi de 37,305µg/L. Estudos realizados pela EPA (1979) para *D. magna* expostas ao Dimilin® mostraram uma CL₅₀-48 h de 0,15µg/L.

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. Alguns desses testes já têm sido feitos no Laboratório de Peixes do Departamento de Veterinária da UFV, Viçosa/MG, supervisionados pelo Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin, a fim de avaliar o efeito de diversos tóxicos (Thiodan®, Roundup Transorb®, Dimilin®) em peixes como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), o lambari (*Astyanax bimaculatus*) e o mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). Dentre os trabalhos realizados no Laboratório de Peixes do Departamento de Veterinária da UFV, destacam-se:

MONTOYA (2008), que avaliou os efeitos do Thiodan® (controle, 0,5µg/L, 1,0µg/L e 1,4µg/L) na morfologia testicular de tilápia (*Oreochromis niloticus*) imatura, onde os peixes foram expostos por 96h. Foram observadas necroses testiculares e diminuição da população de espermatogônias primárias, diminuição da área testicular, alterações na estrutura dos espermátócitos e também perda acentuada das funções teciduais causadas por necroses e danos ao tecido conjuntivo e, nos casos mais graves, necrose avançada dos testículos, perda parcial ou total do mesotélio, apontando o Thiodan® como tóxico, constatando efeitos negativos na estrutura testicular de das tilápias (*Oreochromis niloticus*) imaturas expostas a ele. MORAES (2011) determinou a CL₅₀-96 h do Thiodan® para o lambari (*Astyanax bimaculatus*) exposto por 96h, obtendo o valor de 13,6µg/L. Analisou, ainda, os efeitos do Thiodan® nas concentrações 1,3; 2,6 e 5,2 µg/L em brânquias com os animais divididos em cinco grupos (controle, sem adaptação e sem alimentação, sem adaptação e alimentados 2x ao dia, com adaptação de 10 dias e sem alimentação, com adaptação de 10 dias e com alimentação 2x ao dia). Foi encontrada redução de diâmetro e

número de células de cloreto, a diminuição da espessura das lamelas primárias e de comprimento das lamelas secundárias, o aumento do número de células de muco, o aumento no diâmetro de aneurismas e aumento da vasodilatação, mostrando que o Thiodan® pode ser considerado tóxico ao lambari *Astyanax bimaculatus*, comprometendo funções vitais das brânquias através das alterações em seu epitélio laminar. NUNES (2011) analisou a toxicidade aguda e o efeito subletal do Roundup Transorb® na estrutura testicular do mato grosso (*Hyphessobrycon eques*). Previamente foi determinada a CL₅₀ 96 h por exposição dos peixes ao tóxico em duas diferentes temperaturas (22° e 24° C) obtendo o valor de 2,64µg/L para a CL₅₀ realizada em 22° C, e o valor de 2,18 µg/L a 24° C. O experimento mostrou redução de cistos de espermatídes, do diâmetro tubular, do número de espermatogônias A e B e de espermatócitos I, além da redução de cistos de espermatócitos. Houve aumento do rompimento de cistos e alterações relacionadas a necrose, como a picnose celular e a vacuolização. GOULART (2012) também determinou a CL₅₀-96 h do Dimilin® para o mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) (22,4 µg/L). GOULART (2012), LEANDRO (2014) e LOPES (2015) realizaram ensaios de toxicidade do Dimilin® nos tempos de 96 h e 17 dias em sistema estático, utilizando os peixes mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) como biomarcadores. Para esses testes de toxicidade, foram utilizadas as concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 µg/L de Dimilin®. Para o teste de 96 h foi utilizada uma única aplicação no início do experimento; para o teste de 17 dias foram utilizadas duas aplicações (no início e com 72 h após a primeira aplicação). GOULART (2012) analisou efeito na morfologia testicular, onde foi observada a redução do número de espermatogônias B nos dois experimentos, e maior percentual de tecido alterado no experimento de 17 dias. Foram observadas também 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.

LEANDRO (2014) avaliou histologicamente os ovários de fêmeas maduras do mato grosso (*Hyphessobrycon eques*) expostas ao Dimilin®, encontrando diferença significativa no diâmetro médio dos folículos ovarianos em desenvolvimento secundário intermediário, com o diâmetro médio dos folículos sendo maior no

experimento de 17 dias. LOPES (2015) discriminou as possíveis respostas à ação do inseticida Dimilin® por meio das alterações na morfologia das brânquias de machos e fêmeas de *Hyphessobrycon eques* através da exposição subletal a este inseticida, observando alterações morfológicas nas brânquias de machos e fêmeas, alterações essas que podem levar ao comprometimento das funções teciduais das brânquias. Com esses resultados pode-se considerar o *H. eques* como bioindicador da contaminação ambiental por Dimilin® para avaliações ambientais.

Com a finalidade de testar se a exposição a níveis subletais do tóxico provocam alterações na morfologia branquial, fêmeas de *Hyphessobrycon eques* foram expostas a diferentes tratamentos de Dimilin® por MARCON *et al.* (2016). Foram observadas lesões patológicas, tais como hiperplasia, fusão lamelar, congestão vascular, desordem lamelar secundária, vasodilatação, hemorragia e aumento do epitélio lamelar, sendo mais significativas nas brânquias dos peixes expostos a Dimilin® do que o controle. Alterações significativas no diâmetro dos vasos sanguíneos, na largura das lamelas primárias e no comprimento das lamelas secundárias e no aparecimento de focos de hemorragia em também foram observadas em todas as concentrações testadas. O índice de alteração histopatológica foi leve a moderado mesmo em baixas concentrações de Dimilin® o que pode indicar que este tóxico pode comprometer a função deste tecido. Estes achados indicam que o uso indiscriminado de Dimilin® pode afetar adversamente a integridade estrutural das brânquias de *H. eques*, o que pode causar inúmeros problemas para sistemas de piscicultura.

Dos trabalhos desenvolvidos no laboratório de Biologia de Peixes, DVT, UFV, alguns artigos relacionados a eles já foram publicados, além de um grande número de resumos em diversos eventos científicos locais, regionais, nacionais e internacionais.

2.5. Hematologia em peixes

O estudo da hematologia é considerado uma importante ferramenta para o processo de diagnóstico de doenças (YOLBAS *et al.*, 2016). As técnicas usadas em mamíferos são amplamente aplicadas em peixes; no entanto, com algumas modificações. A presença de eritrócitos nucleados e trombócitos em peixes pode

causar dificuldade na identificação das células sanguíneas, principalmente na contagem de leucócitos totais (TAVARES-DIAS; OLIVEIRA-JÚNIOR; MARCON, 2008). O estudo dos parâmetros sanguíneos em peixes tem sido frequentemente utilizado para a detecção de alterações fisiopatológicas em diferentes condições (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2005).

O quadro hematológico de peixes tem sido estudado para se avaliar alterações quando expostos a agrotóxicos. Consequências da exposição a metais pesados já foram observadas em *Hoplias malabaricus* (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006), *Oreochromis niloticus* (AL-OTAIBI *et al.*, 2019) e *Oreochromis mossambicus* (SUGANTHI *et al.*, 2019).

O estudo dos parâmetros sanguíneos em peixes é significativo para determinar condições relacionadas à sua capacidade fisiológica, estando o sangue diretamente ligado ao metabolismo intermediário responsável pelas transformações no interior do organismo, indicando também fatores intrínsecos e extrínsecos que podem influenciar nos valores quantitativos causados por algum nível de estresse (RANZANI-PAIVA, 2018). O estresse é um dispositivo de reparação fisiológica que o indivíduo assume em resposta a condição física ou química que funciona como o agente estressor, e os fatores bioquímicos são muito susceptíveis às concentrações subletais desses agentes estressores (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2016).

2.6. Recuperação de peixes após exposição a agrotóxicos

Devido à plasticidade dos peixes (ABELHA; AGOSTINHO; GOULART, 2001), alguns estudos têm sido feitos com o objetivo de verificar possíveis recuperações dos indivíduos expostos a diferentes tóxicos (RUSCONI *et al.*, 2018). Peixes foram expostos por BEGUM (2005) ao carbofuran durante 6 dias, e após essa exposição foram transferidos para água limpa, durante 6 dias para estudar a recuperação. Tecidos de fígado e músculo foram coletados a partir dos peixes expostos, da tanto do grupo exposto ao tóxico seguido de recuperação quanto do controle, no final do 1º, 3º e 6º dias. As enzimas exibiram padrões de recuperação diferentes no fígado e músculo de *Clarias batrachus*, mostrando que os peixes podem ter respostas diferentes de recuperação dependendo do órgão em estudo (BEGUM, 2005).

Toxicidade aguda do monocrotófos foi estudada em cérebro, músculo e brânquias de *Oreochromis mossambicus* por RAO (2007). Estudos de recuperação foram realizados em intervalos regulares de 1, 7, 14, 21, 28 dias em água limpa, para se estabelecer o curso de tempo de 50% e 100% de recuperação desses tecidos. Os peixes conseguiram recuperação considerável quando transferidos para água limpa após 14 dias.

CERQUEIRA; FERNANDES (2002) avaliaram alterações na morfologia de brânquias e respostas dos parâmetros de bioquímica sanguínea em curimatá (*Prochilodus scrofa*) após 96 h de exposição de ao cobre e depois da transferência para água potável para se avaliar possíveis recuperações. Danos na morfologia de brânquias foram caracterizados pela elevação epitelial, edema celular e lamelar. Restauração da estrutura branquial foi lenta, sem melhora do tecido nos dois primeiros dias em água limpa. A partir do 7º até o 15º dias a recuperação começou a se tornar evidente, com recuperação completa ocorrendo no dia 45 em água limpa. Hematócrito, glóbulos vermelhos e concentração da hemoglobina mostraram um aumento significativo após a exposição ao cobre e com estabilização no 7º dia de água limpa. A restauração de tecido das brânquias levou mais tempo que a recuperação de parâmetros sanguíneos, possivelmente implicando necessidades de energia extra, o que pode ser crítico, dependendo do ciclo de vida do peixe.

DRAREDJA; SOLTANI (2001) constataram que o Dimilin® provocou atraso no crescimento do peixe mosquito *Gambusia affinis* expostos por 24 h a concentração de 78 mg/L. Essa mesma espécie exposta durante 15 dias a 200 mg/L de Dimilin®, apresentou aumento na excitabilidade 2,5 vezes superior ao grupo controle com dois dias de exposição. O comportamento do grupo exposto ao Dimilin® 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 Dimilin®.

MORAES *et al.* (2016) avaliaram as taxas metabólicas do *Ictalurus punctatus* exposto ao fenol por quatro dias e após recuperação por sete dias. Durante o período de exposição o catabolismo de lipídeos foi observado através da redução de ácidos graxos livres no fígado. Foi observado também o aumento da concentração de amônia e da atividade da aspartato aminotransferase no músculo. As alterações bioquímicas foram exacerbadas após o período de recuperação. Reduções no conteúdo de

proteína muscular e plasmática indicam proteólise. Uma preferência catabólica por lipídeos foi observada na tentativa de suprir a elevada demanda energética.

VÁZQUEZ; MEIJIDE; NOSTRO (2016) analisaram a recuperação da capacidade reprodutiva da Cará macho (*Cichlasoma dimerus*) após exposição durante 60 dias a concentrações 0, 30, 150 e 300 µg/L do químico estrogênico 4-terc-octilfenol (OP). Após a exposição, os peixes foram transferidos para água livre de OP por mais 60 dias. Foram encontrados comprometimentos na arquitetura testicular nas maiores concentrações de OP. A recuperação da organização testicular começou a ser analisada no dia 14 em água limpa, quando houve o recomeço da proliferação do epitélio germinativo. Uma diminuição gradual da fibrose testicular foi observada nos animais expostos a 150µg/L OP a partir do sétimo dia de recuperação, a restauração completa para essa dosagem foi observada no dia 14. Nos peixes expostos a 300µg/L de OP, a recuperação da organização testicular começou a ser observada no dia 14 após a transferência para a água limpa. A funcionalidade total testicular foi recuperada no dia 28 em todas as concentrações de exposição.

2.7. Avaliação comportamental

A ecotoxicologia tem utilizado o comportamento animal como importante ferramenta, e essa vem ganhando uma atenção crescente, devido ao fato de apresentar sensibilidade e poder ser associada a teste de CL₅₀ (Van GESTEL, 2012). A vantagem da resposta comportamental é devida à integração de processos bioquímicos e fisiológicos que refletem mudanças podendo atingir diversos níveis, chegando até em níveis mais altos de organização com relevância ecológica (BAPTISTA; BUSS; EGLER, 2003).

Como o comportamento serve de elo entre processos fisiológicos e ecológicos, talvez seja ideal para estudar os efeitos poluentes ambientais. Os peixes são um excelente modelo nesse sentido, uma vez que muitos comportamentos ecologicamente relevantes de peixes são facilmente observados e quantificados em um cenário controlado. Além disso, há um grande número de pesquisas sobre fisiologia de peixes, consideração necessária para estudos integrativos. De fato, muitos pesquisadores propuseram o uso de indicadores comportamentais em peixes

para monitorar criticamente a contaminação ambiental (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

A mudança da qualidade da água, quando a mesma está contaminada por agrotóxicos, causa mudanças comportamentais imediatas como os efeitos no sistema neuroendócrino, nas membranas epiteliais. Dentro de alguns minutos a horas, podem se ver alteradas as respostas bioquímicas, o metabolismo, fluidos corpóreos e enzimas (CREMONESE, 2014). Após dias ou semanas de exposição, se veem alteradas as respostas fisiológicas, o consumo de oxigênio, além de desregulação do balanço osmótico, efeitos na alimentação e digestão. Depois de dias e meses de exposição, alteração no desempenho fisiológico e efeitos que alteram o crescimento e a reprodução (PERES; MOREIRA, 2003). Meses e anos após a exposição, podem ser observados impactos nas populações. Anos e décadas depois, podem gerar efeitos na estrutura e dinâmicas de comunidades e até mesmo prejudicar a função e a estrutura de ecossistemas (GOMES *et al.*, 2000).

O comportamento é um efeito em nível individual de um dado organismo e é definido pela ação ou reação a um determinado conjunto de circunstâncias, em níveis molecular, físico e/ou ecológico (SCOTT; SLOMAN, 2004). Alterações comportamentais resultam das condições a que um organismo está sujeito e representam um efeito agudo e/ou cumulativo. Representa, ainda, uma interface única entre fatores intrínsecos e extrínsecos que determinam a sobrevivência de um organismo (LITTLE *et al.*, 1990; AMORIM, 2014). Inúmeros padrões comportamentais podem ser empregados como *endpoints* toxicológicos, por serem observados com facilidade e quantificados, parâmetros como *feedback* de medo/fuga; aspetos associados com a tendência de locomoção, capacidade de reprodução ou habilidade de alimentação; além da agressividade; memória; entre outros (AMORIM, 2014). LITTLE *et al.* (1990) indicaram quatro medidas de comportamento - atividade espontânea de natação, capacidade de nado, comportamento alimentar e vulnerabilidade à predação - para serem avaliadas como indicadoras de toxicidade subletal em animais expostos a contaminantes.

Alterações comportamentais podem ocorrer em concentrações significativamente inferiores às necessárias para causar efeitos fisiológicos evidentes (FAUCHER *et al.*, 2006), mas capazes de alterar consideravelmente o comportamento

normal das espécies. A fisiologia e comportamento possuem uma relação instável, tanto os traços comportamentais (por exemplo, agressividade) como fisiológicos (por exemplo, taxa metabólica) frequentemente apresentam uma variação ampla e consistente entre indivíduos da mesma espécie e essa variação pode ter claras consequências para o condicionamento físico e a evolução das histórias de vida (BURTON *et al.*, 2011).

Alguns exemplos de compostos com este potencial incluem o etinil estradiol, presente nas pílulas anticoncepcionais e comum em águas residuais, com capacidade de diminuir a agressividade em diversos organismos; metais pesados, capazes de provocar o aumento dos custos metabólicos, afetando negativamente o balanço energético e levando a um aumento de comportamentos associados à predação (aumento da voracidade); ou ainda pesticidas, que afetam negativamente a capacidade de orientação e navegação (MONTIGLIO; ROYAUTE, 2014).

A maioria das pesquisas conduzidas até hoje discutiu as respostas comportamentais diretas de peixes aos poluentes aquáticos, tais como preferência/distanciamento e tremores corporais (ARIAS *et al.*, 2007). Mais recentemente, a pesquisa começou a enfocar os impactos de poluentes ambientais em comportamentos complexos de peixes que normalmente ocorrem na natureza (BIEGER *et al.*, 2010). Por exemplo, a interrupção de comportamentos associados a forrageamento, evitar predadores, reprodução e hierarquias sociais pode ser mais relevante em termos ambientais do que respostas comportamentais simples a substâncias tóxicas ao considerar impactos potenciais em populações de peixes (KASUMYAN, 2001).

De modo a evitar os impactos da poluição aquática em todos os ecossistemas, a pesquisa multidisciplinar torna-se cada vez mais importante (TURRA *et al.*, 2017). Devido à sua integração inevitável com outros níveis de organização biológica, o comportamento deve ser considerado não isoladamente, mas como preditor e resultado de outros processos biológicos internos e externos (TUNDISI *et al.*, 2006). Embora se considere um ponto de vista comportamental prático, as medidas ecologicamente relevantes dos efeitos toxicológicos são importantes, na medida em que são condicionadas pela consideração concomitante de ambos os indicadores fisiológicos e ecológicos de toxicidade (VAMOSI; SCHLUTER, 2002).

Estudos de comportamento de peixes ocorrem principalmente em um ambiente de laboratório, onde as interações de pares ou grupos maiores de peixes são observadas em ambientes que variam de simples, quaternários ou coloniais, que simulam ecossistemas naturais (SLOMAN; ARMSTRONG, 2002).

O complexo comportamental é necessário para a área de sobrevivência da produção de integração de muitos sistemas fisiológicos. Os sistemas sensoriais, hormonais, neurológicos e metabólicos contribuem para o desempenho desses comportamentos (FERREIRA *et al.*, 2012).

O metabolismo do peixe é influenciado por muitas funções fisiológicas diferentes. Disfunção metabólica causada por poluentes aquáticos poderia, por conseguinte, ocorrer devido à interrupção de vários níveis fisiológicos. Além disso, o metabolismo está intimamente associado ao estado comportamental dos peixes (SLOMAN *et al.*, 2000).

Processos podem ter profundas influências no comportamento normal dos peixes. A desregulação metabólica de todo o organismo tem sido indicada de várias maneiras, mais comumente ilustradas por taxas metabólicas de restrição alterada (ou seja, consumo de oxigênio ou taxa de ventilação) ou diminuídas com desempenho (ou seja, velocidade crítica de natação) (MOURA, 2013). Por exemplo, metais pesados, cobre e cádmio e o pesticida organoclorado, dieldrin, mostraram alterar uma dessas variáveis (RAJOTTE; COUTURE, 2002). Mesmo que a exposição a substâncias tóxicas não altere a taxa metabólica, podem existir compensações metabólicas entre a desintoxicação e outros processos normais (WAHRLICH; ANJOS, 2001). HANDY *et al.* (1999) expôs a truta arco-íris ao cobre a 500 mg/kg por dia durante 90 dias) e mediu a taxa metabólica e o comportamento de natação. Embora o consumo de oxigênio, as taxas de ventilação e a química sérica (glicose, triglicérides, proteínas, íons) não tenham sido afetados pela exposição ao cobre, a truta passou muito tempo realizando atividades rotineiras, sugerindo a extração de recursos metabólicos para compensar o efeito do tóxico.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos, determinar a CL_{50} para o Dimilin® para a espécie *Astyanax bimaculatus* e analisar possíveis alterações provocadas pela exposição aguda, avaliando-se parâmetros hematológicos e morfológicos, além de aspectos comportamentais da espécie proposta para estudo. Este trabalho ainda propõe a desintoxicação do animal estudado, verificando a capacidade de recuperação orgânica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 150 peixes da espécie lambari *Astyanax bimaculatus* obtidos de tanques de terra da Piscicultura da Prata, Eugenópolis/MG, selecionados lambaris machos adultos sexualmente maduros. Os peixes foram utilizados para determinação da CL₅₀-48h e para a realização dos ensaios experimentais. Os peixes foram adquiridos em novembro de 2018 na Fazenda Prata, em Eugenópolis, Minas Gerais (21°05'55" S e 42°11'13" O), na bacia do rio Paraíba do Sul e transportados para o Laboratório de Biologia de Peixes do DVT/UFV, onde foram aclimatados às condições do laboratório por um período de 20 dias em aquários com capacidade de 50L, obedecendo à razão de um centímetro de comprimento corporal de peixe para cada litro de água.

Foi utilizada água livre de cloro e temperatura controlada em 24±1°C por meio de termostatos e termômetros, com monitoração duas vezes ao dia, com troca de água diária inferior a 10% do volume do aquário. Todos os aquários contaram com sistema de filtração (250L/h), e aeração contínua de água para garantir o bem estar dos peixes. A iluminação artificial foi mantida por um período de 12h/dia. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (às 10 e às 16 h) com ração comercial para peixes contendo 28% de proteína, oferecida à vontade, seguindo manejo da piscicultura.

Todo o material e as metodologias utilizadas nos ensaios estão indicados nas normas de bioensaios estabelecidas pelas resoluções da Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15499 e NBR 15088 (ABNT, 2015; 2016) para avaliação da toxicidade de agentes químicos.

Todos os procedimentos envolvendo os animais seguiram as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV, tendo sido realizados e supervisionados pelo Dr. Laércio dos Anjos Benjamin, CRMV - MG 3387 (protocolo n. 56/2017).

4.2. Agrotóxico

Para a avaliação proposta, foi utilizado o inseticida diflubenzuron em sua apresentação comercial Dimilin® (CHEMTURA) em pó. As concentrações utilizadas no presente experimento foram estabelecidas após a levaram determinação da CL₅₀-48h.

4.3. Determinação da CL₅₀-48h do Dimilin® para *A. bimaculatus*

De acordo com a resolução da Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR 15088 (ABNT, 2016) para avaliação da toxicidade de agentes químicos, os testes preliminares foram conduzidos em sistema estático durante 48h, sem substituição ou sifonagem de água e sem alimentação durante o período de exposição ao Dimilin®. O teste de toxidade aguda para a determinação da concentração letal 50 (CL₅₀) foi realizado a partir cinco concentrações para o produto e um grupo controle sem o toxico distribuídas de forma inteiramente casual (Controle; 5mg/L; 15mg/L; 45mg/L; 135mg/L; 405mg/L).

Foram utilizadas três repetições com cinco peixes para cada concentração do tóxico, totalizando 90 peixes. Os peixes foram mantidos em recipientes de plástico de 1,5 L com cinco animais por repetição (Figura 3). A contagem de peixes mortos foi realizada a cada 6h, por um período de 48h. A iluminação artificial foi mantida por um período de 12h/dia.

Figura 3 – Teste de toxicidade aguda para a determinação da CL₅₀ (GOULART, 2019).



Conforme o Guia 203 da OECD (2001), depois de definida a concentração da CL₅₀-48h, as concentrações para 96h foram estipuladas sem extrapolar a proporção de 75% da dose subletal de Dimilin® encontrada na CL₅₀-48h. Essa recomendação foi adotada porque a toxicidade de algumas substâncias pode ser maior ou menor dependendo da idade, sexo ou massa corpórea dos animais testes em relação à atuação de um mesmo tóxico.

4.4. Aquários experimentais e aplicação do inseticida: exposição por 96 h

Os testes de toxicidade aguda com o Dimilin® foram realizados baseando-se nas normas técnicas para teste em sistema estático (NBR 15088 - ABNT, 2016). Os testes para avaliação dos efeitos do inseticida após aplicação direta na água foram conduzidos em aquários de vidro.

Foram utilizados um grupo controle e três diferentes concentrações (3,0; 6,0 e 12,0 mg/L) do tóxico, com 12 animais por concentração, totalizando 48 animais. Nesse valor de 138 peixes foram incluídos 10% previstos para uma possível perda por mortalidade eventual durante essas fases experimentais. Assim, foram utilizados 150 peixes para essa proposta de estudo.

Durante o experimento os animais foram alimentados normalmente, levando em consideração a situação natural do peixe em seu meio ambiente. Por se tratar de um sistema estático, não foram realizadas limpeza e troca de água dos aquários durante o período experimental (96h), a fim de conservar as concentrações do tóxico na água. Como não ocorreu renovação de água, os aquários foram aerados constantemente com difusores conectados a um soprador de ar. A iluminação artificial foi mantida por um período de 12h/dia e a temperatura controlada em 24±1°C por meio de termostatos e termômetros, com monitoração duas vezes ao dia.

Os grupos experimentais foram então constituídos, cada um por 12 animais, com três diferentes concentrações do Dimilin® e um grupo controle sem o tóxico, totalizando 48 animais. As concentrações utilizadas foram estabelecidas após a determinação da CL₅₀-48h. Previamente a este procedimento, os animais foram pesados com a finalidade de se formarem grupos homogêneos. Ao longo do período experimental, foram observadas e anotadas a mortalidade e a sobrevivência dos

animais. Os peixes também foram monitorados quanto ao comportamento social e estabilidade na água do aquário.

As amostras de testículos de seis peixes por concentração foram coletadas após o período de 96h, com os peixes sendo anestesiados com solução de benzocaína 1:10.000, seguida de eutanásia por aprofundamento da anestesia, para os procedimentos de pesagem, determinação do comprimento e obtenção de testículo e sangue para estudo.

4.5. Transferência para água livre do tóxico: período de desintoxicação

Ao final do tempo proposto de 96h, os demais peixes, seis de cada concentração, foram transferidos para aquários contendo água livre do tóxico para se avaliar possíveis recuperações durante o período proposto de sete dias. Os peixes ficaram em água limpa, em aquários com aeração contínua, filtro mecânico, e troca de água diária inferior a 10% do volume do aquário. A iluminação artificial foi mantida por um período de 12h/dia. A temperatura foi controlada entre $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ por meio de termostatos e termômetros, sendo sua aferição realizada duas vezes ao dia no mesmo instante em que foi disponibilizada alimentação à vontade com ração comercial para peixes. As amostras de testículos de seis por concentração foram coletadas após o período de sete dias, com os peixes sendo anestesiados com solução de benzocaína 1:10.000, seguida de eutanásia por aprofundamento da anestesia, para os procedimentos de pesagem, determinação do comprimento e obtenção de testículo e sangue para estudo.

4.6. Avaliação comportamental

Um etograma com parâmetros comportamentais para peixes foi feito (Quadro 1), usando o método de amostragem de varredura instantânea. Os comportamentos analisados foram agrupados em categorias: movimentação, interação agonística, manutenção e comportamentos associados ao estresse, usando o método *ad libitum* na experimentação e se baseiam na metodologia utilizada por SOARES *et al.* (2016).

Quadro 1 – Categorias de comportamentos a serem analisados.

Categoria	Comportamento	Descrição
Movimentação	Nado lento	Nado lento em qualquer direção
	Nado rápido	Nado rápido em qualquer direção
	Nado em grupo	Deslocamento dirigido de vários animais, lento ou rápido
	Emerge e submerge	Emerge na superfície, apresenta resp. aérea rápida e submerge
	Sem movimentação	Não apresente deslocamento de pelo menos 5s
Interação agonística	Perseguição	Nado rápido em direção ao oponente, fazendo ou não contato físico
	Escape	Afastar-se da perseguição ou ataque do oponente
	Ataque frontal	Ataque mútuo com a posição de boca aberta, enfrentando outros peixes
	Ataque lateral	Ataque, mordendo o lado do corpo do oponente
Comportamentos associados ao estresse	Respiração aérea	Respiração aérea por, pelo menos, 5s
	Pulando	Pulando para fora da superfície da água
	Nado errático	Deslocamento em espiral
	Deitado no fundo	Imobilidade no fundo do aquário por pelo menos 5s
	Nado na superfície	Deslocamento próximo à superfície
	Coprofagia	Comendo fezes
	Parado verticalmente	Posição vertical de cabeça para cima por, pelo menos, 5s

Fonte: SOARES *et al.* (2016).

O padrão de comportamento foi dividido em três categorias, quanto à movimentação, interação social e comportamentos associados ao estresse. Foram realizadas observações em 16 parâmetros para cada aquário, duas vezes ao dia, sendo que o tempo de observação foi de aproximadamente um minuto seguido por um minuto de espera (esse período de descanso é importante para que não se crie um viés de observação), perfazendo 30 minutos por aquário por dia, totalizando 5 (cinco) observações (SOARES *et al.*, 2016).

Foram registradas observações comportamentais duas vezes ao dia durante o teste agudo, utilizando uma tabela binária graduada em 0 (zero) e 1 (um), sendo o 0 (zero) quando não foram observadas modificações de acordo com a categoria avaliada, e 1 (um) para quando observadas, com base em um ponto fixo a uma distância de 1,5 m do aquário, distância utilizada para não influenciar o comportamento dos peixes, conforme orientação de SOARES *et al.* (2016).

As atividades dos animais foram registradas usando o método de amostragem de varredura instantânea, onde uma varredura rápida de todo o grupo amostral foi feita em intermissões regulares, e o comportamento de cada espécime foi registrado naquele instante. Uma única inspeção pode levar de poucos segundos a minutos, de acordo com o tamanho do grupo, levando em conta também o número de informações registradas para cada categoria (ALTMANN, 1974).

Ainda que as analogias tenham sido periodicamente vistas entre características fisiológicas e comportamentais específicas em diversos animais, a origem dessas associações tem variado. Uma origem importante dessas alterações é a influência de estressores ambientais, que são capazes de revelar, mascarar ou modular a covariação em características fisiológicas e comportamentais (BURTON *et al.*, 2011).

4.7. Obtenção de dados biométricos

Após as 96h do ensaio experimental e do período de sete dias de desintoxicação, foram coletados seis peixes de cada aquário (grupos controles e tratados). Foram obtidos dados biométricos como peso corporal, comprimento total e comprimento padrão. As medidas de comprimento, em centímetros, foram obtidas com auxílio de paquímetro (Figura 4).

Figura 4 – Medidas de comprimento obtidas com auxílio de paquímetro (GOULART, 2019).



O peso corporal, em gramas, foi determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g (Figura 5). Os valores de comprimentos total e padrão e peso corporal foram obtidos para cada animal e, posteriormente, calculou-se média e desvio padrão para cada grupo estudado. A partir desses valores foi determinado o fator de condição.

a) Fator de condição (K)

$$K = \frac{PC \times 100}{CP^3}$$

PC= peso corporal

CP= comprimento-padrão

Figura 5 – Peso corporal em balança de precisão (GOULART, 2019).



Para averiguar a homogeneidade dos lotes foi feita uma comparação nos e entre experimentos nas várias concentrações utilizadas avaliando os parâmetros de peso corporal, comprimento padrão e comprimento total dos peixes. A tabela 3 apresenta as médias de peso, comprimento total e comprimento padrão e fator de condição para *A. bimaculatus* de cada grupo experimental após exposição ao Dimilin® por 96h seguido de período de desintoxicação por sete dias.

Tabela 3 – Comprimento total (mm), comprimento padrão (mm), peso corporal (g) e fator de condição (g/cm) para *A. bimaculatus* em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.

Concentração	Comprimento total		Comprimento padrão		Peso corporal		Fator de condição	
	96h	7 dias	96h	7 dias	96h	7 dias	96h	7 dias
Controle	64,39 ^a ±3,37	64,00 ^a ±12,61	53,47 ^a ±2,76	50,42 ^a ±9,89	3,74 ^a ±0,61	4,08 ^a ±2,49	0,55 ^a ±0,06	0,60 ^a ±0,21
3mg/L	60,4 ^a ±6,71	57,64 ^a ±6,57	48,37 ^a ±5,18	46,49 ^a ±5,09	2,91 ^a ±0,97	2,79 ^a ±0,91	0,42 ^a ±0,10	0,47 ^a ±0,10
6mg/L	65,58 ^a ±3,23	60,80±2,49	52,9 ^a ±2,29	48,85 ^a ±3,02	3,63 ^a ±0,49	3,09 ^a ±0,47	0,52 ^a ±0,03	0,50 ^a ±0,06
12mg/L	63,34 ^a ±6,20	57,97 ^a ±7,06	51,36 ^a ±4,80	44,2 ^a 3±6,30	3,42 ^a ±0,80	2,56 ^a ±1,16	0,46 ^a ±0,09	0,43 ^a ±0,15

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as concentrações no período experimental (96h ou 7 dias). Dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis.

Dentro da mesma espécie, peixes menores apresentam menor resistência a agentes tóxicos quando comparados com peixes maiores (SILVA *et al.*, 2016). Assim, os grupos experimentais foram constituídos de lotes de tamanhos homogêneos, demonstrados na tabela 4, para evitar que o efeito do tóxico sofresse interferência deste fator. Nos testes de toxicidade efetuados, a população foi isomórfica de acordo o padrão estabelecido pelo guia OECD 203 (OECD, 2001).

4.8. Análise de água

A água foi amostrada no início (antes da aplicação do inseticida) e no final do experimento para cada uma concentração de cada um dos aquários experimentais e encaminhadas para análise no Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental, do Departamento de Engenharia Civil/UFV, Viçosa/MG. Foram determinados os valores de turbidez, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio (DBO, mg/L O₂), amônia (mg/L NH₃), dureza Ca (mg/L CaCO₃), dureza Mg (mg/L CaCO₃), cloro (mg/L Cl₂), dureza total (mg/L CaCO₃).

O pH foi monitorado diariamente no laboratório utilizando-se de um *kit* de teste para aquário (Figura 6), juntamente com a temperatura que foi monitorada por meio de termômetro.

Figura 6 – Kit Labcon Test (GOULART, 2019).



A manutenção dessa água em caixa d'água de 1000L com 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 físico-químicos.

4.9. Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de testículos de seis animais por concentração para se avaliar alterações morfológicas após 96h de exposição ao tóxico, com os peixes sendo anestesiados com solução de benzocaína 1:10.000, seguida de eutanásia por aprofundamento da anestesia, para os procedimentos de pesagem, determinação do comprimento e obtenção do tecido para estudo. A remoção dos fragmentos dos testículos ocorreu após incisão longitudinal ventral da parede da cavidade celomática. O fixador usado foi o paraformaldeído a 4% em tampão fosfato pH 7,2. Após a fixação, os fragmentos de testículo foram transferidos para álcool 70%.

Os fragmentos foram destinados à inclusão em resina glicol-metacrilato (Historesin/Leica). Nesse caso, o material transferido em álcool 70% foi trocado para álcool 90% por 4h. Em seguida, foi mantido em uma solução álcool: resina 1:1, por 12h, transferido para resina de infiltração onde permaneceu por mais 24h, e logo após foi incluído em historesina pura + endurecedor. As amostras foram incluídas em moldes apropriados e colocadas em estufa (60° C/24 h).

Após a polimerização da historesina, as amostras foram colocadas em pequenos blocos de madeira para a realização de cortes de 3µm de espessura em micrótomo Leica 2055 Multicut, com navalha de vidro, e utilizados para as mensurações celulares e descrição das características morfológicas observadas nos grupos controles e nos grupos tratados. Os cortes foram colocados em lâminas e corados com azul de toluidina e hematoxilina-eosina, montadas com Entellan (Merck), analisadas em microscópio de luz e as imagens foram capturadas por meio de câmera digital Moticon 580, 5.0 MP, acoplada a fotomicroscópio Olympus CX31, para estudos morfométricos.

4.10. Hematologia

Para estudos hematológicos, o sangue foi coletado por punção cardíaca utilizando seringas de insulina descartáveis com agulha 13x4,5 contendo anticoagulante heparina (Figura 7).

Figura 7 – Sangue coletado por punção cardíaca (GOULART, 2019).



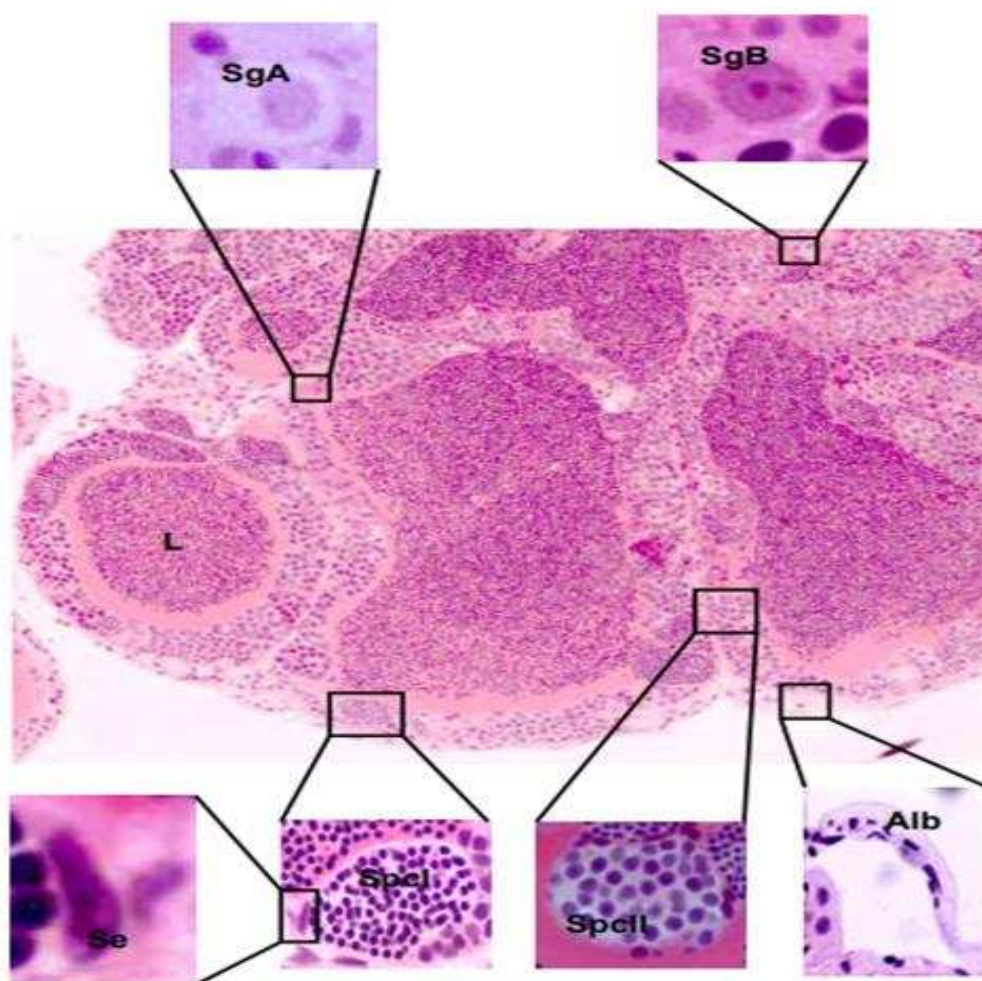
O hematócrito (HCT) foi realizado em duplicatas (GOLDENFARB; BOWYER; HALL, 1971), e seguindo o protocolo de AMEND; SMITH (1974). A determinação do hematócrito (HCT) foi conduzida a partir de um *pool* de seis peixes para cada concentração, os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva.

Para contagem diferencial dos leucócitos foram produzidas lâminas de extensão confeccionadas em duplicata e coradas segundo ROSENFELD (1947). A contagem diferencial fornece a porcentagem relativa de cada tipo de glóbulo branco e também ajuda a revelar populações anormais de glóbulos brancos (HRUBEC; SMITH, 2010). O número total de leucócitos foi obtido subtraindo a porcentagem de trombócitos do total de leucócitos mais trombócitos contados com uma câmara de Neubauer. Com o número total de leucócitos (leucócitos; /mL) e o número relativo de leucócitos (%), foi possível calcular o número absoluto (/mL) de neutrófilos (Nf), linfócitos (Lf), monócitos (Mf), eosinófilos (Ef), basófilos (Bf), células granulocíticas especiais (SGC) e trombócitos (Trb) encontrados nas amostras de esfregaço de sangue, conforme proposto por HRUBEC; SMITH (2010).

4.11. Análise histológica

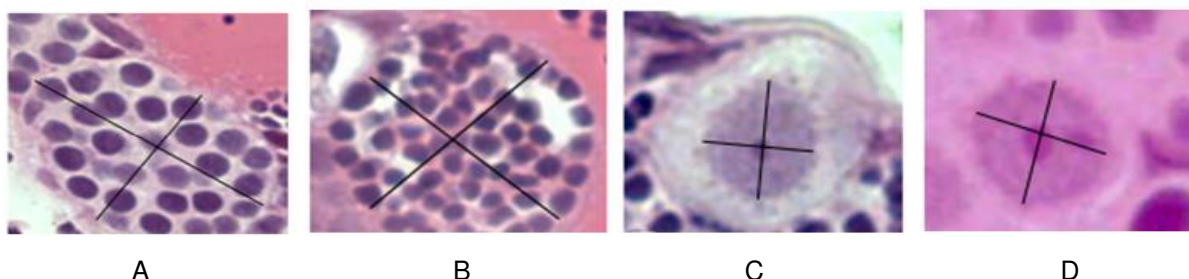
Foi realizada a análise histomorfométrica. Para cada animal foram analisados 10 campos, comparando-se o tecido dos animais de cada tratamento com o dos animais do grupo controle. Os dados morfométricos foram obtidos por meio de mensurações de núcleos de células da linhagem espermatogênica (espermatogônias A e B, e espermatócitos I e II), dos cistos de espermatócitos I e II e dos cistos de espermátides (Figura 8).

Figura 8 – Organização estrutural do testículo. Em destaque: SgA. Espermatogônia A ou primária; SgB. Espermatogônia B ou secundária; L. Luz do túbulo com espermatozoides e secreção tubular; Se. Célula de Sertoli delimitando um cisto; Spc I. Cisto de espermatócito primário; Spc II. Cisto de espermatócito secundário; Alb. Albugínea testicular. HE. Aumento: 100X. Encartes: 400X. Fonte: SILVA FILHO (2010).



Foram mensurados 10 núcleos de cada geração de espermatogônias (A e B) 50 núcleos de espermatócitos I e II, e 10 cistos de espermatócitos I, 10 de espermatócitos II e 10 de espermátides. O diâmetro médio foi calculado a partir do valor de dois diâmetros dispostos perpendicularmente entre si (Figura 9). As mensurações foram realizadas no programa Image J. (*Media Cybernetics*).

Figura 9 – Morfometria dos cistos de espermatócitos e dos núcleos espermatogônias. A. Diâmetro de cistos de espermatócitos I; B. Diâmetro de cistos de espermatócitos II; C. Diâmetro do núcleo espermatogônia A; D. Diâmetro do núcleo de espermatogônia B. 400X.HE. Fonte: SILVA FILHO (2010).



4.12. Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran e Bartlett) e, posteriormente à análise de variância para testar as variações nos valores médios nos momentos das coletas entre os grupos controle e os grupos tratados. Quando apresentaram significância, foi realizado o teste de Tukey ($P < 0,05$) para comparar as médias entre tratamentos quando foram registradas diferenças significativas. Quando não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (SAEG, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação da CL₅₀-48h do Dimilin® para *Astyanax bimaculatus*

A CL₅₀-48h calculada nesse teste foi de 97,1mg/L, e o intervalo de confiança obtido pela média móvel foi de 63,8 a 147,6 mg/L ($P < 0,05$). A concentração de 405mg/L de Dimilin® foi suficiente para levar à morte todos os peixes em apenas 24h (Tabela 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 (NBR 15499, ABNT, 2015).

GOULART (2012) calculou a CL₅₀-96h do Dimilin® para o mato grosso *H. eques* de 22,4mg/L com intervalo de confiança de 13,9 a 34,8 mg/L obtido pela média móvel ($P < 0,05$) a uma temperatura média de 22,4°C. FISCHER; HALL (1992) testaram a CL₅₀-96h do Dimilin® para a espécie *Fundulus hereroclitus* e encontraram o valor de 32,99mg/L. Para tilápia-do-Nilo, a CL₅₀-96h do Dimilin® encontrada nos estudos de ABE (2012) foi de 15,43mg/L. CL₅₀-96h de 152mg/L de Dimilin® para *Poecilia reticulata* foi calculada por SOUZA (2008).

Durante a realização do presente teste para determinação da CL₅₀-48h do Dimilin® para o peixe lambari, foi observado comportamento anormal nos peixes, essas alterações também foram observadas por MONTROYA (2008) em *Oreochromis niloticus* e por SILVA FILHO (2010) em *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao Thiodan® (endossulfan), e por NUNES (2011) em *H. eques* expostos ao Roundup Transorb®.

5.2. Análise de água

Todos os parâmetros físico-químicos mensurados encontraram-se em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais em geral, baseando-se no HUET (1983), bem como com a resolução nº 357 do CONAMA (2005), que determina a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos da água para *A. bimaculatus* em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.

Parâmetros	Dia 0	96h				7 dias	Valor de referência
		Controle	3mg/L	6mg/L	12mg/L		
pH	7,6	7,0	7,2	7,3	7,5	7,5	6,0-9,0 (*)
Temperatura (°C)	22,0	21,6	22,0	21,0	21,5	24,4	22-26 (**)
Turbidez (UNT)	1,91	2,64	3,68	19,56	30,28	2,55	<40,00 (*)
OD (mg/L O ₂)	5,04	5,29	5,63	5,04	3,28	3,78	-
DBO (mg/L O ₂)	1,18	1,93	2,07	2,73	4,24	2,14	<5, 0 (*)
Amônia (mg NH ₃ /L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0 a 0,25 (*)
Dureza Ca (mg/L CaCO ₃)	13,6	17,00	13,60	13,60	11,90	7,93	< 20mg/L(**)
Dureza Mg (mg/L Mg(HCO ₃) ₂)	13,59	11,89	15,29	18,69	20,40	3,37	< 200mg/L(**)
Cloro (mgCl ₂ /L)	<limite	<limite	<limite	<limite	<limite	<limite	0,01 (*)
Dureza Total (mg/L CaCO ₃)	27,2	28,9	28,9	32,3	32,3	27,2	20-400 (***)

ND= Não Detectado (*) CONAMA 357/05 (Classe 2 - Conselho Nacional do Meio Ambiente. (**) CASAL (2010). (***) SWANN (2008).

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 e o sangue. A qualidade da água foi mantida em condições adequadas para peixes ao longo dos períodos experimentais. A água utilizada nas duas etapas do experimento foi a água tratada para consumo humano, porém livre de cloro.

O pH esteve dentro da faixa considerada por CASAL (2010) como ideal para a espécie, que é de 5,0 a 7,8. O bom crescimento dos peixes ocorre quando os níveis de oxigênio estão superiores a 6mg/L. O pH recomendado para peixes tropicais

encontra-se entre 5,5 e 9, visto que valores inadequados podem prejudicar o desempenho dos peixes.

Os teores médios de amônia não ionizada encontrados no experimento de intoxicação 96h (não detectado, inferiores a 0 a $0,25 \pm 0,001$ 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).

Os valores da temperatura aferida ficaram entre os desejados para cultivo e criação de peixes tropicais, que varia entre $20,0$ a $28,0^{\circ}\text{C}$ (CYRINO; ROUBACH; FRACALOSSI, 2012) propiciando estudar a resposta ao agrotóxico em condições ideais nesse parâmetro.

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 um ótimo crescimento de organismos aquáticos. A qualidade da água foi mantida em condições adequadas para peixes ao longo dos períodos experimentais, e os parâmetros mensurados não indicaram interferência ou sinergismo com a ação do produto testado.

5.3. Análise comportamental

O parâmetro nado lento (NL) foi o evento de comportamento mais observado para todos os grupos, os grupos expostos ao Dimilin® por 96h apresentaram aumento significativo quando comparados ao controle pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), principalmente os expostos à concentração de 3mg/L. Essa foi a única diferença estatística encontrada na categoria relacionada a movimentação (Tabela 5).

Com relação às categorias de interação agonística, comportamentos exibidos (Tabela 5) aumentaram ($P < 0,05$) em relação ao controle. Tais comportamentos também foram observados por SCOTT; SLOMAN (2004) que relatam que a exposição aos agrotóxicos pode motivar um desequilíbrio social entre os peixes e pode aumentar ou diminuir esses comportamentos agonistas. De acordo com SLOMAN *et al.* (2003), a sensibilidade aos tóxicos é capaz de interferir nos parâmetros comportamentais ligados ao status social, podendo tornar os peixes subordinados mais propensos à agressividade, reforçando os resultados encontrados neste estudo. Espécimes com

linhas sociais específicas conseguiriam, assim, apresentar alterações no comportamento que exageram as associações observadas entre as características fisiológicas e comportamentais dentro de um mesmo ambiente de exposição ao tóxico (SLOMAN *et al.*, 2003), conforme os ambientes expostos ao Dimilin® no presente experimento.

Tabela 5 – Análise dos parâmetros comportamentais do *A. bimaculatus* expostos ao Dimilin® por 96h.

Parâmetro	Controle	3mg/L	6mg/L	12mg/L
Nado lento (NL)	15 ^b ±6	15 ^a ±0	11,8 ^a ±0,40	10,2 ^a ±0,75
Nado rápido (NR)	13,4±2,73	12±2,73	11,8±2,93	11±3,58
Nado em grupo (NG)	14,6±0,80	15±0	14,8±0,40	12,2±5,60
Emerge e submerge (ES)	10,2±5,88	12,2±2,71	5±2,28	5,2±3,19
Sem movimentação (SM)	4,4±5,95	14,4±0,80	11,2±5,58	12±1,73
Perseguição (PG)	3,2±5,91	10,4±3,83	9,6±0,71	9,8±1,47
Escape (EP)	0,4 ^a ±0,49	8,8 ^a ±3,20	9,6 ^{bc} ±0,71	9,8 ^{bc} ±1,47
Ataque frontal (AF)	0,4 ^a ±0,49	5,4 ^a ±2,58	7,4 ^b ±1,09	8,6 ^c ±1,74
Ataque lateral (AL)	-	3 ^b ±1,53	2,4 ^a ±1,09	2,4 ^a ±1,85
Respiração aérea (RA)	-	0,4±0,80	0,4±1,85	1,6±1,20
Pulando (PL)	-	0,4±0,45	1,8±0,49	2,6±1,74
Nado errático (NE)	-	0,6±0,80	1,6±1,83	3,6±2,33
Deitado no fundo (DF)	-	1±1,55	0,4±2,33	1±0,63
Nado na superfície (NS)	-	0,8±0,98	1±0,49	1,4±1,20
Coprofagia (CP)	-	2,2 ^a ±2,23	2,4 ^a ±1,26	3 ^b ±0,89
Parado verticalmente (PV)	-	0,2 ^a ±0,40	1 ^a ±1,36	2,6 ^b ±1,02

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (P<0,05). Dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis.

Para comportamentos associados ao estresse (Tabela 5) foram observadas alterações comportamentais ($P>0,05$) para os parâmetros coprofagia (CP) e parado verticalmente (PV) em todos os grupos experimentais, principalmente na maior concentração (12mg/L). SARIKAYA *et al.* (2004) que estudaram os efeitos do inseticida neurotóxico fenitrothion em *Corydoras paleatus*, e observaram alterações comportamentais como nado errático, ausência de movimento temporário (parado verticalmente) e copofragia. Estes comportamentos foram aumentados no experimento quando a concentração de fenitrothion foi maior. Com os parâmetros comportamentais de coprofagia (CP) e parado verticalmente (PV) verificados neste trabalho, pode-se dizer que os peixes sofreram interferência do Dimilin® no seu comportamento, conforme analisado por SARIKAYA *et al.* (2004).

Entre os comportamentos relacionados ao estresse, pulando (PL), nado errático (NE), deitado no fundo (DF) e nado na superfície (NS) só foram observados nos grupos expostos ao Dimilin® (Tabela 5). De acordo com KOLOK; HARTMAN; SERSHAN (2002), os contaminantes químicos podem ampliar as relações entre características fisiológicas e comportamentais, existindo variação intraespecífica na resistência fisiológica aos poluentes, gerando o potencial de desarmonia comportamental associada durante exposição aos tóxicos, inferindo diretamente em comportamentos correlacionados ao estresse.

A toxicologia comportamental aflorou como uma ferramenta promissora para preencher a divisão que existe nos experimentos entre laboratório e campo, e segundo PYLE; FORD (2017) o comportamento animal engloba a fisiologia animal e as circunstâncias ambientais a que este animal está submetido, corroborando assim as observações feitas neste estudo.

5.4. Análises hematológicas

Como pode-se observar na tabela 6 nota-se uma redução significativa entre o hematócrito (HCT) do grupo controle e o HCT dos grupos expostos ao Dimilin® por 96 h, principalmente na maior concentração (12mg/L). As alterações observadas nas taxas de HCT neste estudo após 96 h de exposição do *Astyanax bimaculatus* ao Dimilin® (Tabela 6) mostram uma condição anêmica dos peixes, que pode ser

consequência da diminuição na biossíntese das células vermelhas do sangue. Este estado pode causar baixa no rendimento do transporte do oxigênio para os tecidos (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008).

Tabela 6 – Valores de HCT e ocorrência de hemólise para *Astyanax bimaculatus* após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.

Parâmetro	Controle	3mg/L	6mg/L	12mg/L
HCT 96h	12	8	3	2
HCT 7 dias	10	12	10	10
Hemólise 96h	Discreta	Discreta	Ausente	Moderada
Hemólise 7 dias	Discreta	Discreta	Ausente	Moderada

HCT= Expresso em %. Análise descritiva. *Pool* de 6 (seis) peixes.

O *Brycon cephalus* (Günther, 1869) foi exposto a uma concentração de 2mg/L de metil paration por 96h e apresentou redução nos valores de hematócrito (AGUIAR *et al.*, 2004), dados que corroboram os obtidos no presente estudo. De acordo com AGUIAR *et al.* (2004) essa redução pode indicar uma anemia. Anemia geralmente vem a ser anemia microcítica, pois os eritrócitos imaturos complementam a multiplicidade das células na passagem periférica e são de menor tamanho que os eritrócitos maduros (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008).

Segundo SVOBODA *et al.* (2001) *Cyprinus carpio* também apresentou queda nos valores de hematócrito quando exposta por 96 h a 32,5mg/L de diazinon. A queda nos valores de hematócrito se dá devido à ação interruptora do agrotóxico no tecido eritropoiético. De acordo com os autores SVOBODA *et al.* (2001) essa queda e a ação interruptora no tecido eritropoiético afeta a viabilidade das células sanguíneas. Outro fator que também afeta o tecido eritropoiético e pode causar a queda do HCT é a associação às lesões das brânquias, que levam a uma hipóxia interna, ocasionando as alterações da eritropoiese (AREECHON; PLUMB, 1990).

O hematócrito do *A. bimaculatus* para o grupo controle (Tabela 6) é inferior ao descrito por PEREIRA *et al.* (2018) para o mesmo peixe que foi de $33,0 \pm 3,0$. Porém, além de se tratar de espécie coletada em condições ambientais diferentes, deve-se

levar em consideração o tamanho dos espécimes analisados, já que indivíduos de tamanhos diferentes possuem taxa de metabolismo intermediário relacionadas diretamente ao seu tamanho corporal, sendo capaz de interferir nas suas taxas hematológicas (TAVARES-DIAS *et al.*, 2000). Outras condições como sazonalidade, sexo, maturação gonadal, o estado nutricional e variação genética também influenciam expressivamente as variáveis hematológicas (KORI-SIAKPERE, 1985).

Existem ainda as diferenças nos protocolos de coletas de sangue, que também podem influenciar resultados hematológicos finais em peixes, como o tipo de anticoagulante empregado. TAVARES-DIAS; SANDRIN (1998) compararam os anticoagulantes heparina e EDTA, e demonstraram que o hematócrito e a hemoglobina do sangue coletado com seringas heparinizadas apresentaram maiores valores que o sangue colhido com seringas utilizando EDTA, se empregando um mesmo animal, essas são dificuldades de trabalhar com hemograma em peixes, mas não invalidam os dados obtidos.

Após a recuperação de sete dias (Tabela 6) o hematócrito da maior concentração (12mg/L) mostrou aumento de 400% em relação ao período de intoxicação de 96h; as demais concentrações também apresentaram valores aumentados quando comparados a esse período, podendo supor assim que ao se analisar o HCT, no período de sete dias os peixes conseguiram recuperar esse parâmetro sanguíneo. Essa mesma situação foi observada por CERQUEIRA; FERNANDES (2002) quando avaliaram dos parâmetros de bioquímica sanguínea em curimbatá (*Prochilodus scrofa*) após 96h de exposição ao cobre, e após a transferência para água potável para se avaliar possíveis recuperações. O hematócrito, glóbulos vermelhos e concentração da hemoglobina mostraram aumento significativo após a exposição ao cobre, com estabilização no sétimo dia de água limpa, indicando que para esses dois poluentes sete dias de desintoxicação em água limpa talvez sejam suficientes para que o HCT se reestabeleça.

EL-SHERIF; FEKY; AMAL (2008) investigaram o efeito bioquímico do diazinon no estudo com *O. niloticus* (0,28 e 1,87 ppm por 30 dias). A exposição dos peixes tratados a sete dias de depuração em água limpa proporcionou recuperação no conteúdo total de proteínas do soro sanguíneo. Os autores concluíram que a boa administração ambiental dos corpos de água pode proteger a saúde humana e o meio

ambiente dos pesticidas perigosos. Assim, a avaliação das respostas metabólicas ao se comparar os resultados do hematócrito do *Astyanax bimaculatus* no período de desintoxicação de sete dias após exposição ao Dimilin® por 96h, revelou que estes foram restabelecidos, como se esperava haver uma melhora na necessidade metabólica para que ocorresse a desintoxicação do organismo (Tabela 6).

O efeito hemolítico tendo agentes tóxicos como principais responsáveis ocorre através de mecanismos que não são específicos, podendo acontecer quando ocorre a solubilização da membrana plasmática do eritrócito; esta membrana se rompe por tornar-se em mais tênue. Outro fator que pode levar a hemólise é a incidência da lise osmótica, mediante variação que a hemácia sofre na permeabilidade da membrana plasmática (APARICIO *et al.*, 2005). Em contrapartida, agrotóxicos também podem provocar hemólise através da oxidação da hemoglobina, produzindo metemoglobina (BUKOWSKA; KOWALSKA, 2004). Estes fatores podem ter influenciado na hemólise durante este experimento (Tabela 6).

Deve-se levar em consideração também que algumas causas no decorrer da coleta de sangue podem ocasionar a hemólise *in vitro*. Um dos fatores mais relevantes pode ser o excesso de manuseio e pressão em cima da região que vai ser puncionada. É preciso também tomar cuidado ao aspirar o sangue, para que não seja muito rápido para dentro da seringa, e também não se deve utilizar um calibre muito pequeno na agulha da coleta (BASTOS; BERNER; RAMOS, 2010; SARMENTO, 2005). Talvez seja um dos fatores de interferência na hemólise deste experimento, ao se observar a formação de hemólise mesmo nos grupos de peixes não estavam expostos ao tóxico. Isso por que, devido ao tamanho e peso dos peixes, necessitou-se de agulha de pequeno calibre e podendo interferir no resultado da amostra, sendo umas das limitações encontrados na coleta.

Os valores de linfócitos, células elípticas de núcleo fusiforme, e eosinófilos, células pequenas de núcleo arredondado, encontrados no presente estudo não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados tanto para o experimento de 96h quanto para o experimento de desintoxicação de sete dias (Tabela 7). PIMPÃO *et al.* (2005), ao estudarem o tóxico deltametrina na concentração de 0,3mg/kg durante 96h de exposição ao peixe nativo *Ancistrus multispinis*, também

não encontraram diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle para os parâmetros de células sanguíneas mensuradas.

Observou-se diminuição de neutrófilos e eosinófilos e aumento de linfócitos e monócitos nos grupos expostos ao Dimilin® quando comparados com o grupo controle. No experimento de 96h, os neutrófilos demonstraram diferença entre os grupos (Tabela 7). Os neutrófilos em peixes são células arredondadas e com núcleo em bastonete ou redondo (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2000). A queda no número de neutrófilos nos grupos das concentrações 3mg/L e 12mg/L (Tabela 7) pode indicar em um primeiro momento estresse metabólico, causando um possível enfraquecimento do sistema imunitário. Entretanto, o aumento no número de neutrófilos na CII pode indicar possível reação de defesa, preparando para que o organismo possa combater o estressor, já que estas células sanguíneas estão diretamente ligadas ao sistema imune não-específico e são as primeiras células a serem solicitadas diante das infestações com parasitas ou outros estressores como poluentes e agrotóxicos (CASTRO, 2006). Isso pode assinalar que cada organismo responde de forma diferente às diferentes concentrações do agrotóxico.

Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e trombócitos para *A. bimaculatus* em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.

Concentração	Neutrófilos		Linfócitos		Monócitos		Eosinófilos		Trombócitos	
	96h	7 dias	96h	7 dias	96h	7 dias	96h	7 dias	96h	7 dias
Controle	9,2 ^{aA} ±3,24	7,5 ^{aB} ±2,38	41,4 ^{aA} ±7,41	70,6 ^{aB} ±1,98	4,2 ^{aA} ±2,41	5,1 ^{aA} ±1,46	1,2 ^{aA} ±1,46	1,6 ^{aA} ±1,90	44 ^{aA} ±10,89	15 ^{aB} ±1,93
3mg/L	5,6 ^{aA} ±2,76	7,5 ^{aB} ±2,33	55 ^{aA} ±7,86	48,5 ^{aB} ±4,23	7,3 ^{aA} ±3,37	7,3 ^{aA} ±1,04	0,6 ^{aA} ±0,87	0,5 ^{aA} ±0,75	31,3 ^{bA} ±9,53	19,5 ^{aB} ±2,76
6mg/L	14 ^{bA} ±3,51	14 ^{aA} ±2,59	54 ^{aA} ±8,46	54 ^{aA} ±3,44	4,8 ^{aA} ±1,55	6,1 ^{aA} ±1,37	3,8 ^{aA} ±2,64	3,8 ^{aA} ±1,98	23 ^{cA} ±4,41	23 ^{aA} ±1,12
12mg/L	5,5 ^{cA} ±1,61	5,5 ^{aA} ±2,53	48,6 ^{aA} ±6,72	48,6 ^{aA} ±10,01	6,1 ^{aA} ±2,34	6,1 ^{aA} ±1,37	0,3 ^{aA} ±0,75	0,3 ^{aA} ±2,27	45,1 ^{bcA} ±7,06	45,1 ^{aA} ±8,76

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas (P<0,05) entre as concentrações no período experimental (96h ou sete dias). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (P<0,05) entre os tratamentos nos diferentes tempos avaliados (96h e sete dias). Dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis (linfócitos e trombócitos). Dados paramétricos, *post hoc* Tukey (neutrófilos, monócitos e eosinófilos)

Os trombócitos, células de tamanho médio, formato elíptico, com núcleo denso ou fusiforme (MABILIA; SOUZA, 2006), também estão envolvidos no processo de defesa do organismo, sendo responsáveis pela coagulação sanguínea (BOZZO *et al.*, 2007). A queda em suas taxas ao se comparar os tempos de 96h com sete dias pode indicar que sua barreira defesa pode já ter sido desfeita assim que o peixe foi retirado do agrotóxico. Porém, esses dados ainda permaneceram altos na maior concentração, indicando ainda possível trombocitose (Tabela 7).

AKINROTIMI; ORLU; GABRIEL (2013) analisaram parâmetros hematológicos de tilápias expostas a efluentes industriais e observaram redução significativa dependente da concentração ($P < 0,05$) nos valores linfócitos e trombócitos e aumento gradativo nos valores de leucócitos, neutrófilos, monócitos à medida que a concentração dos efluentes industriais aumentavam. Essas alterações foram mais pronunciadas na *Tilapia guianensis* exposta a 0,30, 0,20 e 0,50mg/L de efluentes. Os efluentes industriais, assim como o Dimilin® aqui analisado, podem causar algum nível de estresse, conforme manifestado pelas mudanças nos parâmetros hematológicos dos peixes.

A homogeneidade dos dados do hematócrito encontrado para *Astyanax bimaculatus* mostrou que o uso de parâmetros hematológicos para avaliação do estado de saúde dos peixes deve ser cuidadosamente estudado, a fim de compreender as variações intrínsecas a serem usadas apenas para estabelecer um padrão. No entanto, conclusões confiáveis requerem um número suficiente de amostras para obter uma avaliação significativa. Embora vários estudos relacionados à hematologia de peixes tenham sido conduzidos, a definição dos intervalos de valores de referência normais é bastante difícil e complicada (VÁCHA, 1980; HONORIO; MARTINS, 2018).

Muitos estudos anteriores com dados confiáveis sobre hematologia de espécies de teleósteos foram conduzidos. Entre eles, é importante destacar os dados compilados por TAVARES-DIAS; MORAES (2004) que publicaram informações abrangentes sobre os parâmetros hematológicos das espécies teleósteos. O fator mais importante que limita a análise hematológica como ferramenta de diagnóstico de doenças e alterações em peixes é a grande diferença em espécies de peixes e a variação nos tipos, números e aparência dos leucócitos, bem como a variação

considerável de seus valores relatados em peixes saudáveis, inclusive dentro de uma mesma espécie. Também é parcialmente afetada por diferenças na metodologia utilizada, bem como pela interpretação subjetiva dos tipos de células pelo investigador.

5.5. Análises histológicas

Pode-se observar que houve diferença estatística ($P < 0,05$) para mensurações dos núcleos de espermatogônia B (Spg B), espermatócito I (Spc I) e espermatócito II (Spc II), sendo esta mais marcante entre o controle e a maior concentração (12 mg/L). Não foram constatadas diferenças ($P > 0,05$) para o diâmetro dos núcleos de espermatogônia A (Spg A) (Tabela 8).

As exposições a substâncias tóxicas em diferentes fases do ciclo de vida têm como características gerais relacionadas ao aparelho reprodutor, o retardamento de fases de desenvolvimento e da maturação gonadal, a redução no número e viabilidade de gametas, histopatológicas e redução do número e viabilidade de descendentes (RAND; PETROCELLI, 1985; ADAMS, 1990; VÁZQUEZ; MEIJIDE; NOSTRO, 2016). A função testicular, incluindo a secreção de andrógenos e a produção de espermatozoides férteis, pode ser afetada adversamente por mecanismos diversos (FALLAH; MOHAMMAD-HASANI; COLAGAR, 2018).

Tabela 8 – Diâmetro médio (μm) de núcleos de espermatogônias (Spg) A e B e de núcleos de espermatócitos (Spc) I e II para *A. bimaculatus* em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.

Concentração	Spg A		Spg B		Spc I		Spc II	
	96h	7 dias	96h	7 dias	96h	7 dias	96h	7 dias
Controle	8,64 ^{aA} ±1,30	8,85 ^{aA} ±0,70	7,03 ^{aA} ±0,82	7,06 ^{aA} ±0,31	5,62 ^{aA} ±0,64	5,71 ^{aA} ±0,23	4,47 ^{aA} ±0,54	4,43 ^{aB} ±0,20
3mg/L	8,57 ^{aA} ±1,37	8,74 ^{aA} ±0,79	6,88 ^{abA} ±0,68	7,07 ^{aA} ±0,68	5,06 ^{bA} ±0,47	5,45 ^{aB} ±0,47	4,36 ^{aA} ±0,52	4,39 ^{bB} ±0,11
6mg/L	8,32 ^{aA} ±1,06	8,55 ^{aA} ±0,33	6,62 ^{bcA} ±0,94	6,98 ^{aA} ±2,41	5,04 ^{bA} ±0,50	5,35 ^{aB} ±1,74	4,17 ^{bA} ±0,53	4,20 ^{cdA} ±1,45
12mg/L	8,39 ^{aA} ±0,97	8,72 ^{aA} ±2,78	6,42 ^{cA} ±0,98	7,00 ^{aA} ±1,55	4,82 ^{cA} ±0,64	5,11 ^{bB} ±1,19	3,90 ^{cA} ±0,44	4,00 ^{cdB} ±0,90

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as concentrações no período experimental (96h ou sete dias). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os tratamentos nos diferentes tempos avaliados (96h e sete dias). Dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis (Spc I, Spc II). Dados paramétricos, *post hoc* Tukey (Spg A, Spg B).

Segundo DE ROOIJ; RUSSELL (2000) em mamíferos e peixes as espermatogônias do tipo B dividem-se mais rapidamente que as espermatogônias tipo A, como indicado pelo índice mitótico cinco vezes maior das espermatogônias do tipo B sobre espermatogônias tipo A no bagre africano (SCHULZ *et al.*, 2005). Uma vez que o processo de mitose das espermatogônias do tipo A é mais lento que na linhagem B, talvez 96h de exposição ao tóxico pode não ser suficiente para que elas sofram algum tipo de alteração (CLERMONT, 1972) como observado na tabela 8.

Foram observadas reduções ($P < 0,05$) para diâmetros médios de cistos de espermatócito I (cisto Spc I), cistos de espermatócito II (cisto Spc II) e cistos de espermatíde (Spt), sendo esta mais marcante entre o controle e a concentração 12 mg/L. Esta redução pode ter ocorrido devido a redução do tamanho e número de núcleos presentes dentro dos respectivos cistos quantificados (Tabela 8). Essas mesmas estruturas foram analisadas por SILVA FILHO (2010) quando avaliou os efeitos do Roundup™ e do Thiodan® em machos adultos de *Astyanax bimaculatus*. Este autor também encontrou resultados similares ao constatar que os cistos de espermatócitos II dos grupos expostos ao Thiodan® apresentaram menor diâmetro nas concentrações 1,15 e 2,3 mg/L.

Observam-se na tabela 8 os resultados das análises histológicas do período de desintoxicação de sete dias, quando os peixes após a intoxicação por 96h por Dimilin®, foram transferidos para água limpa, livre do tóxico, onde permaneceram por esse período para se analisar possíveis efeitos de recuperação. Ao se observar a tabela 8, pode-se perceber que entre os grupos tratados e controle, as medidas tanto de núcleos de espermatogônias A e B, não foram encontradas diferenças estatísticas entre eles, indicando que mesmo os grupos expostos ao Dimilin® por 96h, quando foram transferidos para água limpa por sete dias conseguiram se recuperar, igualando as medidas dos grupos tratados ao do grupo controle.

Quando comparados o tempo de exposição com o tempo de desintoxicação, os diâmetros médios dos núcleos de espermatócitos (Spc) I e II de *A. bimaculatus* apresentaram aumento ($P < 0,05$) indicando uma melhora nos valores dos núcleos com sete dias. Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) nos núcleos de espermatogônias (Spg) A e B, quando comparados em diferentes tempos (Tabela 8). Com isso, pode-se observar que de acordo com o tempo de exposição e a

concentração, as alterações testiculares podem variar, assim como o tempo de recuperação, assim como foi observado neste estudo que com o tempo de exposição de 96h ao Dimilin®, sete dias já foram suficientes para se começar a observar uma recuperação significativa das estruturas testiculares analisadas.

Foi observado neste experimento a diminuição do diâmetro dos cistos contendo Spg B, principalmente na concentração mais elevada (12mg/L) (Tabela 8). PIRES (2013) ao estudar desregulação endócrina em testículos de *Poecilia reticulata* (guppy) causada pelo herbicida glifosato com concentrações de 17,19; 34,39 e 51,58 mg/L por 96h, notou diferenças estatísticas entre os cistos contendo Spc I e II entre a menor concentração (17,13mg/L) e as duas outras (34, 26 e 51, 39 mg/L) durante a exposição de glifosato por 96h ao peixe *Poecilia reticulata*, reforçando os resultados também aqui encontrados para as mesmas estruturas ao se comparar com o controle, principalmente na maior concentração de exposição.

Tabela 9 – Diâmetro médio (μm) de cistos de espermatócito (Spc) I e II, cistos de espermatídeos (Spt), para *A. bimaculatus* em cada grupo experimental após exposição por 96h ao Dimilin® seguido de desintoxicação por sete dias.

Concentração	Cistos Spc I		Cistos Spc II		Cistos Spt	
	96h	7 dias	96h	7 dias	96h	7 dias
Controle	42,64 ^{aA} ±7,46	44,14 ^{aA} ±2,92	35,74 ^{aA} ±5,40	37,32 ^{aA} ±1,73	34,70 ^{aA} ±7,35	33,57 ^{aA} ±2,61
3mg/L	39,00 ^{bA} ±8,05	41,69 ^{aA} ±3,86	34,88 ^{aA} ±5,94	37,23 ^{aA} ±1,73	34,48 ^{bA} ±5,87	33,47 ^A ±2,29
6mg/L	36,72 ^{bA} ±6,87	41,27 ^{aB} ±1,91	33,27 ^{aA} ±5,18	36,18 ^{aA} ±1,87	29,97 ^{bA} ±5,62	32,80 ^{aB} ±1,70
12mg/L	34,55 ^{cA} ±6,47	40,97 ^{aB} ±1,74	29,94 ^{bA} ±4,94	35,43 ^{aB} ±1,68	26,30 ^{cA} ±4,65	29,99 ^{aB} ±1,19

Valores expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as concentrações no período experimental (96h ou sete dias). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os tratamentos nos diferentes tempos avaliados (96h e sete dias). Dados não paramétricos, teste de Kruskal-Wallis (cistos Spc I). Dados paramétricos, *post hoc* Tukey (cistos Spc II e cistos Spt).

Com a diminuição do diâmetro dos cistos, além do menor tamanho das células, um menor número de células presentes nos cistos (Tabela 9), o que concorda com observações de RAND; 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. A desorganização tecidual do testículo pode promover uma redução na funcionalidade e interferir na ação dos hormônios nas células alvo, como nos estudos realizados por DUTTA; MISQUITA; KHAN (2006). Além disso, os autores DUTTA; MISQUITA; KHAN (2006) também acreditam que a espermição pode ser comprometida, assim como admite-se que possa ser comprometida nesse estudo com base na desorganização celular aqui encontrada, principalmente na maior concentração de exposição.

SANTOS *et al.* (2015) ao analisarem testículos de lambari do rabo-amarelo nas concentrações de 0, 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L de zinco por 96 h de exposição, constataram que o aumento na concentração de Zn provocou a formação de aglomerados de células germinativas. Devido a isso, o processo de divisão celular pode não ter sido normalmente concluído, gerando a toxicidade testicular, como perturbações na secreção fisiológica dos hormônios hipofisários FSH e LH, resultando falência testicular (RAMASWAMY; WEINBAUER, 2014.). Essas perturbações podem ser extrapoladas para o presente experimento, ao se pressupor que o Dimilin® atinja estes estádios de interferência nas divisões celulares de Spc I e Spc II. Ambos os tipos de divisão celular são regulados por diferentes mecanismos pelos hormônios hipofisários FSH e LH e podem ser afetados tanto no crescimento quanto em suas divisões (PEREIRA *et al.*, 2017).

BARROS *et al.* (2016) avaliaram a toxicidade subaguda em testículos de ratos machos adultos que receberam, durante 28 dias, concentrações de 0; 2; 4 ou 8 mg/kg/dia de Dimilin®. Em relação aos parâmetros espermáticos, houve diminuição significativa na produção espermática diária (PDE) e na produção espermática diária relativa (PDEr) nos animais expostos à menor concentração (2mg/kg) de Dimilin®. Observou-se, também, naquele grupo, assim como foi observado no experimento aqui realizado (Tabela 9), diminuição significativa no número relativo de espermátides no testículo, percebido pela redução do diâmetro médio dos cistos de espermátides após exposição ao Dimilin®, um provável efeito inibitório no crescimento testicular.

Ao se analisar os diâmetros médios dos cistos de espermatócitos I e II e cistos de espermatídes de *Astyanax bimaculatus* no período de desintoxicação de sete dias, observou-se que não foram encontradas diferenças estatísticas, indicando que uma possível recuperação nos parâmetros analisados já esteja iniciando durante esse período (Tabela 9). SANDSTRÖM (1994) relatou que no período de 1982 e 1987, muitas anomalias foram relatadas em peixes do litoral do mar Báltico efluentes da indústria de polpa Kraft branqueada. Em 1992, o uso de cloro foi interrompido e a exposição dos peixes foi descontinuada. O peixe *Perca fluviatilis* foi selecionado como espécie sentinela naquele estudo, essas espécies demonstravam muitas anormalidades, documentadas em estudos anteriores, como a menor taxa de maturação sexual e a redução do tamanho relativo das gônadas, indicando que ao se interromper a exposição dos peixes a determinados tipos de tóxicos, peixes conseguem recuperar suas funções sexuais e reprodutivas. Esses mesmos eventos também foram observados aqui no presente estudo, quando os peixes começaram a ter as mensurações dos diâmetros médios de seus cistos e núcleos de células normalizadas em relação ao grupo controle nas diferentes concentrações de exposições após o período de desintoxicação (Tabela 9).

Ao se avaliar os diâmetros médios de cistos de espermatócitos I e II e cistos de espermatídes do lambari no período de desintoxicação de sete dias comparados aos diâmetros médios no período de exposição ao Dimilin® por 96h, todos os parâmetros avaliados apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$), indicando possível regeneração celular nesse período (Tabela 10). LINEY *et al.* (2005) descreveram que a interrupção no desenvolvimento dos ductos reprodutivos do peixe ruivaco (*Rutilus rutilus*) expostos a efluentes de estações de tratamento de águas residuais em seus primeiros estádios de vida foram revertidos após a depuração em água sem exposição aos químicos, corroborando os resultados aqui encontrados, indicando que ao se interromper o contato dos peixes com os agentes tóxicos, esses peixes conseguem recuperar suas características reprodutivas.

Conforme os resultados desse experimento, pode-se cogitar que as reações adversas provocadas pela exposição ao Dimilin® em um tempo delimitado, como o tempo aqui utilizado, seriam temporárias e não anunciam impacto ao nível populacional, pelo menos quando se tratar de prejuízos reprodutivos. Contudo, é

necessário levar em conta diferentes fatores que podem resultar em efeitos aditivos e resultados múltiplos (SANTOS *et al.*, 2015).

Analisar 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 e descarte adequado.

Este estudo chama a atenção para o potencial tóxico que Dimilin® apresenta para o lambari, por causar regressão testicular, pela redução das medidas morfométricas, levando à redução dos compartimentos espermáticos, promovendo assim alterações histológicas que podem levar à diminuição ou à perda da funcionalidade do testículo, o *Astyanax bimaculatus* pode ser classificado como uma espécie sensível ao Dimilin®, uma vez que a exposição ao produto nas concentrações utilizadas alterou o padrão tecidual dos testículos. Evidencia-se ainda as consequências biológicas da contaminação ambiental e a possível recuperação de peixes expostos a esta contaminação.

A extrapolação dos resultados aqui encontrados para campo devem ser feitas com cautela, atendendo as concentrações as quais os peixes possam ser expostos no ambiente e está perfeitamente associada à duração da exposição, à bioacumulação, à presença de outras substâncias químicas, ao nível de absorção, materiais residuais, temperatura da água, pH, composição e tipo de tóxico, bem como idade, sexo, tamanho e espécie dos organismos-alvo.

Sugere-se uma verificação mais aprofundada das ações de uma exposição mais prolongada do *A. bimaculatus* ao Dimilin®, como recomendação para estudos futuros.

6. CONCLUSÕES

A CL_{50} calculada do Dimilin® para o lambari *Astyanax bimaculatus* foi de 97,1mg/L com intervalo de confiança de 63,8 a 147,6 mg/L ($P < 0,05$) obtido pela média móvel ($P < 0,05$) a uma temperatura média de 22,4°C.

As alterações comportamentais provocadas pelo Dimilin® apontam para estresse causado pela exposição ao agrotóxico e podem ser usadas para avaliar o risco ecológico, especialmente porque esses comportamentos afetados estão relacionados à sobrevivência, crescimento e reprodução.

A alteração observada pelas mudanças no hematócrito e na contagem diferencial de leucócitos dos peixes é capaz de indicar estresse dos animais frente ao Dimilin®.

O *Astyanax bimaculatus* pode ser classificado como uma espécie sensível ao Dimilin®, uma vez que a exposição ao produto nas concentrações utilizadas alterou o padrão tecidual dos testículos.

O período de sete dias de desintoxicação em água limpa após a exposição aguda ao Dimilin® em concentrações abaixo de 12mg/L foi suficiente para recuperação das alterações hematológicas e testiculares causadas no lambari, demonstrando assim a capacidade de recuperação dos peixes expostos a esta contaminação, indicando a plasticidade que os peixes apresentam.

REFERÊNCIAS

- ABE, F. R., **Avaliação ecotoxicológica e risco ambiental dos inseticidas utilizados no controle da larva de *Aedes aegypti* para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e peixes**. 2012. 144p. Dissertação; Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Biologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP; Jaboticabal, SP. 2012.
- ABE, F. R., *et al.*, Toxicity of Diflubenzuron and Temephos on freshwater fishes: Ecotoxicological assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 3, p. 77-95, 2019.
- ABELHA, M. C. F.; AGOSTINHO, A. A.; GOULART, E., Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Scientiarum**, v. 23, n.2, p. 425-434, 2001.
- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**, 2. Ed. ABNT, 2016, 22p.
- _____, **NBR 15499 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes**, 1. Ed. ABNT, 2015, 21p.
- 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, cap. 19, p. 333-353, 1990.
- AGUIAR, L. H., *et al.*, Metabolic effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research**, v. 95, n.2, p. 224-230, 2004.
- AKINROTIMI, O. A.; ORLU, E. E.; GABRIEL, U. U., Hematological responses of *Tilapia guianensis* treated industrial effluent. **Applied Ecology and Environmental Sciences**, v. 1, n.1, p. 10-13, 2013.
- AL-AZAB, A. M.; SHAALAN, E. A., Evaluation of effectiveness and persistence of three slow release formulations against *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 15, n. 4, p. 841, 2018.
- ALBINATI, A. C. L., *et al.*, Histological biomarkers: chronic toxicity for roundup in piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 621-627, 2009.
- AL-OTAIBI, A. M., *et al.*, Toxicity bioassay and sub-lethal effects of diazinon on blood profile and histology of liver, gills and kidney of catfish, *Clarias gariepinus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 326-336, 2019.
- ALTMANN, J., Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3, p. 227-266, 1974.

AMEND, D. F.; SMITH, L., Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout: Hematological and blood chemical changes in moribund fish. **Infection and Immunity**, v. 11, n.1, p.171-179. 1974.

AMORIM, J. A. S., **Avaliação do espectro de reação de um sistema de diagnóstico por vídeo rastreio de peixes zebra (*Danio rerio*) expostos a cinco tóxicos distintos**. 2014. 79p. Dissertação em Toxicologia e Contaminação Ambientais. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto. Porto. 2014.

ANDRADE, D. R., *et al.*, Biologia reprodutiva da tabarana *Salminus hilarii* (Osteichthyes, Characidae) na represa de Três Marias. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 3, p. 123-128. 2004.

ANGERMEIER, P. L.; KARR, J. R., Fish communities along environmental gradients in a system of tropical streams. **Environmental Biology of Fishes**, v. 9, n. 2, p. 117-135, 1983.

APARICIO, R. M., *et al.*, *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, n. 5, p. 1063-1067. 2005.

AREECHON, N.; PLUMB, J., Sublethal effects of Malathion on channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.44, n. 3, p. 435-441, 1990.

ARIAS, A. R. L., *et al.*, Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

BAPTISTA, D. F.; BUSS, D. F.; EGLER, M., **Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos**. In: PERES, F., MOREIRA, JC., orgs. *É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 157-175. 2003. ISBN 85-7541-031-8.

BARROS, A. L., *et al.*, Subacute toxicity assessment of diflubenzuron, an insect growth regulator, in adult male rats. **Environmental toxicology**, v. 31, n. 4, p. 407-414, 2016.

BASTOS, M. S.; BERNER, A. A.; RAMOS, E. R. P., **Avaliação do grau de hemólise e sua interferência em análises bioquímicas de amostras obtidas por diferentes técnicas de coleta de sangue venoso**. Anais Eletrônico. V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica CESUMAR - Centro Universitário de Maringá. Maringá-Paraná. p. 01-06. 2010. ISBN 978-85-61091-69-9.

BEGUM, G., In vivo biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure. **Pesticide Biochemical and Physiology**, v. 82, n.3, p. 185-196, 2005.

BEIRÃO, B. V., *et al.*, Barotrauma em peixes em usinas hidrelétricas: ferramentas para o estudo. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia**, v. 115, n.1, p. 26-36, 2015.

BIEGER, L., *et al.*, Are the streams of the Sinos River basin of good water quality? Aquatic macroinvertebrates may answer the question. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1207-1215, 2010.

BILLARD, R., La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. I. Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. **Annual Biology Animal Biochem Biophys**. v.9, n. 2, p.251-71. 1969.

_____. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**. v. 26, n. 4, p.877-920. 1986.

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, n.4, p.314-7, 2004.

BOZZO, F. R., *et al.*, Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas. Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins. **Relatório de Produtos Formulados**. Brasília, D. F. 15 de outubro de 2018, 5p. Disponível em: <http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?agrofit_cons&produtos.rdf&p_id_produto_formulado_tecnico=5084&p_origem_report=WEB¶mform=no> Acesso em 03 de setembro de 2019.

_____. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. 2005. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 mar. 2005.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S., Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**. v. 152, n. 1, p. 73-84. 2004.

BURTON, T., *et al.*, What causes intraspecific variation in resting metabolic rate and what are its ecological consequences? **Proceedings Biological Sciences Royal Society**. v. 278, n. 7, p. 3465–3473, 2011.

CAMPOS, C. P., *et al.*, Métodos de controle químico da mosca-dos-chifres. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.11, n. 10, p. 1-8. 2008.

CASAL, C. M. V., **Fish Base**. World Wide Web Electronic Publication. 2010. Disponível em <<http://www.fishbase.org>> Acessado em 11 de abril de 2019.

CASTRO, A. A.; *et al.*, Effect of the insect growth regulator diflubenzuron on the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Ecotoxicology**, v. 21, n. 1, p. 96-103, 2012.

CASTRO, F. J., **Relação parasito-hospedeiro entre pacu, *Piaractus mesopotamicus* e o ectoparasito *Dolops carvalhoi* (Lemos de Castro, 1949): respostas fisiológicas, morfofuncionais e do sistema imune não adaptativo do hospedeiro frente à infestação experimental**. 2006, 154p. Tese (Doutor em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, 2006.

CEMIG/CETEC - Companhia Energética de Minas Gerais, Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, **Guia ilustrativo de peixes do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC: il, mapa. 2000. 144p.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N., Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 2, p. 83-91. 2002.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, **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 maio de 2019.

CHEHADE, C.; CASSEL, M.; BORELLA, M. I., Induced reproduction in a migratory teleost species by water level drawdown. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 1, p. 205-212, 2015.

CHEMTURA CORPORATION, **Ficha de Segurança**, Carechem International Worldwide Coverage, 2006.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E., Hematologic disorders of fish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**. v. 11, n. 3, p. 445-462, 2008.

CLERMONT, Y., Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**. v. 52, n. 1, p.198–236. 1972.

CREMONESE, C., **Exposição a agrotóxicos e distúrbios reprodutivos: estudo em trabalhadores rurais, seus familiares e jovens do município de Farroupilha-RS**. 2014. 225p. Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.

CYRINO, J. E. P.; ROUBACH, R.; FRACALLOSSI, D. M., **Avanços na alimentação e nutrição de peixes carnívoros de água doce**. In: D.M. FRACALLOSSI and J.E.P. CYRINO, eds. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 283-293. 2012.

De ROOIJ, D. G.; RUSSELL, L. D., All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of Andrology**, v.21, n. 6, p.776-798, 2000.

DEBORD, D., G., *et al.*, Systems biology and biomarkers of early effects for occupational exposure limit setting. **Journal of occupational and environmental hygiene**, v. 12, n. 1, p. 41-54, 2015.

DELL'PORTO, A., *et al.*, Efficacy of 25% diflubenzuron for control of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae): *in vitro* and field challenges. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 617-620. 2012.

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, n. 2, p. 857-862, 2001.

DUARTE, C. G.; KAKINAMI, S. H., **Impactos ambientais: análise e medidas**. São Paulo, SENAC, 2018. 204p.

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, n. 1, p. 149-56, 2006.

EL-SHERIF, M. S.; FEKY, E.; AMAL, M., **Effect of ammonia on Nile tilapia (*O. niloticus*) performance and some hematological and histological measures**. In: International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Cairo, Egypt. Proceedings... Cairo, Egypt, v. 8, p.513-530. 2008.

EPA, Environmental Protection Agency, **Tolerances and exemptions from tolerances for pesticide chemicals in or on raw agricultural commodities; diflubenzuron**. Federal Register, v. 44, n. 85, p. 25452-25454, 1979.

ERDAL, J. I., *et al.*, **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.

FALLAH, A.; MOHAMMAD-HASANI, A.; COLAGAR, A. H., Zinc is an essential element for male fertility: A review of zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. **Journal of reproduction & infertility**, v. 19, n. 2, p. 69, 2018.

FAUCHER, K., *et al.*, Impact of cadmium exposures on the trunk lateral line neuromasts and consequences on the "C-start" response behaviour of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). **Aquatic Toxicology**, v. 76. n. 4, p. 278-294, 2006.

FERREIRA, O. G. L., *et al.*, Active aging and its relationship to functional independence. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 21, n. 3, p. 513-518, 2012.

FISCHER, 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.

FRANÇA, E. J., *et al.*, Biodiversity conservation in the Atlantic Forest: inorganic chemical investigation of native trees. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.102, n. 1, p. 349-357. 2005.

FUJIMOTO, R. Y., *et al.*, **Utilização do diflubenzuron no controle de crustáceos parasitos de piaçu, *Leporinus macrocephalus*. Efeitos parasiticida e parâmetros hematológicos.** Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. 133 p.

GARCÍA-LOPEZ, A., *et al.*, Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in *African catfish*. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 357-365, 2008.

GARTENSTEIN, S.; QUINNELL, R. G.; LARKUM, A. W. D., Toxicity effects of diflubenzuron, cypermethrin and diazinon on the development of *Artemia salina* and *Heliocidaris tuberculata*. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v.12, p.83-90, 2006.

GAUTAM, A., *et al.*, Acute inhalation toxicity study of n-heneicosane and its combination with diflubenzuron: An attracticide of *Aedes aegypti*. **Toxicology and industrial health**, v. 34, n. 10, p. 703-713, 2018.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E., Reproducibility in the hematology laboratory: the micro hematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.

GOMES, A. S.; PALMA, J. J. C.; SILVA, C. G., Causas e consequências do impacto ambiental da exploração dos recursos minerais marinhos. **Brazilian Journal of Geophysics**, v. 18, n. 3, p. 447-452, 2000.

GOULART, A. M. A. **Efeitos toxicológicos do Dimilin® em machos adultos de *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei:Characidae).** 2012. 65p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

GRIER, H. J., Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, v. 21, n. 2, p. 345-357. 1981.

GRIER, H. J., **Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier.** In: RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. editors. The Sertoli cell. Clearwater, F. L: Cache River Press, p.704-739, 1993.

GRIER, H. J., *et al.*, Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **The American Journal of Anatomy**, v. 159, n. 3, p.331-45, 1980.

GRIER, H. J.; URIBE, M. C., **Male reproductive system: testis, spermatogenesis and testicular cycles.** In: JAMIESON, B. G. M. (Editor). Reproductive biology and phylogeny of fish (Agnatha and Osteichthyes). New Hampshire: Science Publishers, Plymouth, UK. v. 4, p. 119-142. 2009.

HANDY, B. N., *et al.*, Frictional viscous flow in mylonite with varied biminerallitic composition and its effect on lithospheric strength. **Tectonophysics**, v. 303, n. 1, p.175-191. 1999.

HONORIO, J. R.; MARTINS, I. A., Ichthyofauna of the Una river in the Paraíba do Sul Paulista River Valley, Southeastern of Brazil. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 4, p. 520-528. 2018.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A., **Hematology of fishes**. In: Weiss, D. J & K. J. Wardrop (Eds.). Schalm's veterinary hematology. 6 ed. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell. p. 994-1003, 2010.

HUET, M., **Tratado de piscicultura**, Madrid: Mundi-prensa, 1983.765p.

JUNQUERA, P., *et al.*, Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. **Parasite**, v. 26, n. 26, p. 26-33, 2019.

KAGAMI, T., **Insecticidal, miticidal, nematocidal, molluscicidal, microbicidal, or bactericidal composition and method for controlling pest**. U.S. Patent Application n. 10/321,683, 18 jun. 2019.

KASUMYAN, A. O., Effects of chemical pollutants on foraging behavior and sensitivity of fish to food stimuli. **Journal of Ichthyology**, v. 41, n. 1, p. 76-87. 2001.

KOLOK, A. S.; HARTMAN, M. M.; SERSHAN, J., The physiology of copper tolerance in fathead minnows: insight from an intraspecific, correlative analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 1730–1735, 2002.

KORI-SIAKPERE, O., Haematological characteristics of *Clarias isheriensis* Sydenham. **Journal of Fish Biology**, v. 27, n. 3, p. 259-63, 1985.

KUBITZA, F., *et. al.*, **Planejamento da produção de peixes**. 3. ed. rev. ampliada. Jundiaí: F. Kubitza, 1999, 77p.

KUMAR, R. P.; BABU, KV D.; EVANS, D. A., Isolation, characterization and mode of action of a larvicidal compound, 22-hydroxyhopane from *Adiantum latifolium* Lam. against *Oryctes rhinoceros* Linn. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 153, p. 161-170, 2019.

LACERDA, S. M. S. N., **Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis Niloticus*) como modelo experimental**. 2006. 70p. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

LAWRENCE, C., The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*). **A review. Aquaculture**, v. 269, n. 4, p. 01-20, 2007.

LEANDRO, M. V., **Descrição morfo-histológica do ovário do peixe *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei:Characidae) e efeitos do inseticida diflubenzuron na morfologia ovariana**. 2014. 59p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.

LIMA, F. C. T., *et al.*, **Genera *Incertae Sedis* in Characidae**. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. eds. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS. p.106-169, 2003.

LINEY, K. E., *et al.*, Assessing the sensitivity of different life stages for sexual disruption in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to effluents from wastewater treatment works. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 10, p. 1299-1307, 2005.

LITTLE, E. E., *et al.*, Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout, **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 380–385, 1990.

LOPES, D. S., **Efeitos do inseticida Dimilin® na morfologia de brânquias de machos e fêmeas de *Hyphessobrycon eques* adultos (Steindachner, 1882)**. 2015. 71p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

LOWE-MCCONNELL, R. H., **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo, EDUSP, 1999. 584p.

_____. **Fish communities in tropical freshwaters**. New York, Longman Inc., 1975. 337p.

LU, P. Y.; METCALF, R. L., Environmental fate and biodegradability of benzene derivatives as studied in a model aquatic ecosystem. **Environmental Health Perspectives**, v.10, p. 269–284. 1975.

LUSHCHAK, V. I., *et al.*, Pesticide toxicity: a mechanistic approach. **Experimental and Clinical Sciences, International Online Journal for Advances in Sciences**, v. 17, p. 1101- 1136, 2018.

LUVIZOTTO-SANTOS, R., *et al.*, O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do rio Mogi-Guaçu. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 343-358, 2018.

MABILIA, R. G.; 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.

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.

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.

MARCON, L., *et al.*, Pathological and histometric analysis of the gills of female *Hyphessobrycon eques* (Teleostei:Characidae) exposed to different concentrations of the insecticide Dimilin®. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 135-142, 2016.

MENDES JUNIOR, M. M., *et al.*, Primeiro relato de *Perulernaea gamitanae* (Crustacea: Lernaedidae) em pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). **Ars Veterinaria**, v. 35, n. 1, p. 12-15, 2019.

MIURA, T., **Spermatogenetic cycle in fish**. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). Em cyclopedia of reproduction. San Diego: Academic Press; v. 4, p. 571–578. 1999.

MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T., Efeitos toxicológicos de piretróides (Cipermetrina e Deltametrina) em peixes - Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, p. 1-58, 2012.

MONTIGLIO, P-O.; ROYAUTÉ, R., Contaminants as a neglected source of behavioural variation. **Animal Behaviour**, v. 88, p. 29–35, 2014.

MONTOYA, L. N. F., **Efeitos do Thiodan® sobre a morfologia do testículo de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sexualmente imatura**. 2008. 76p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2008.

MORAES, J. C., **Efeitos do Thiodan® (endossulfan) nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus***. 2011. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

MORAES, F. D., *et al.*, Metabolic responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed to phenol and post-exposure recovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 2, p. 74-80, 2016.

MOREIRA-FILHO, O., **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no "complexo" *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. 1989. 111p. Doctoral thesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 1989.

MOURA, J. F., *et al.*, **Saúde pública e saúde dos oceanos: interface conceitual dos paradigmas e análise de elementos essenciais e não essenciais em organismos marinhos de um ecossistema de ressurgência**. 2013. 147p. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca. Rio de Janeiro. 2013.

NOMURA, H., Fecundidade, maturação sexual e índice gonadossomático de lambaris do gênero *Astyanax* *Baird e Girard*, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 775-798, 1975.

NUNES, L. R., **Toxicidade aguda e efeito subletal do Roundup Transorb® nos testículos de mato grosso *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae)**. 2011. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

OECD/OCDE, OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. **Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method**. Guideline, 2001. 423p.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A., *et al.*, Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**, v. 101, n. 1, p. 74-80, 2006.

PAIVA, S. R.; DERGAM, J. A.; MACHADO, F., Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**, v. 560, n. 1, p. 393-404, 2006.

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, EMBRAPA soja, Londrina, PR, p. 121-126, 2006.

PAPADIMITRIOU, K., *et al.*, Stress physiology of lactic acid bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 837-890, 2016.

PELIZARO, M. G., *et al.*, Rhythm of development in the oocyte of the tambiu *Astyanax bimaculatus* (Reinhardt, 1874)(Pisces:Characidae): a morphometric and histochemical study. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 92, n. 4, p. 415-431, 1981.

PEREIRA, L.S., *et al.*, Effects of long and short flooding years on the feeding ecology of piscivorous fish in floodplain river systems. **Hydrobiologia**, v. 795, n. 1, p. 1-16. 2017.

PEREIRA FILHO, H. P., **Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari prata (*Astyanax scabripinnis* Jenyns, 1842), em condições de cativeiro**. 2000. 94 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2000.

PEREIRA, M. O., *et al.*, **Diferenciação hematológica e biométrica entre machos e fêmeas do lambari do rabo amarelo *Astyanax bimaculatus***. X Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI), [Anais...] Campus Videira, p. 01-05, 2018.

PERES, F.; MOREIRA, J. C., **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2003. 384p.

PIMPÃO, C. T., *et al.*, Avaliação da estimulação de LPS na migração celular em *Rhamdia quelen* expostos à Deltametrina. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 3, n. 4, p. 11-17, 2005.

PIRES, F. S., **Disrupção endócrina em testículos de *Poecilia reticulata* causada pelo herbicida glifosato**. 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 2013.

PUDNEY, J., Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v.32, n. 6, p. 459-497, 1995.

PYLE, G.; FORD, A., Behaviour revised: contaminant effects on aquatic animal behaviour. **Aquatic Toxicology**, v. 182, n. 1, p. 226-228, 2017.

RAJOTTE, J. W.; COUTURE, P., Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 59, n. 8, p. 1296–1304, 2002.

RAMASWAMY, S.; WEINBAUER, G. F., Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/testosterone. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 2, p. e996025, 2014.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. 665p.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; FELIZARDO, N. N.; LUQUE, J. L., Parasitological and hematological analysis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 from Guarapiranga reservoir. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 231-237, 2005.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., *et al.*, Avaliação Hematológica de Espécies de Peixes Comerciais da Várzea do Alto Rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Ciências Biológicas**, v. 22, n. 2, p. 507-513, 2000.

RANZANI-PAIVA, M. J. T., Características hematológicas de tainha, *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região Estuarino-Lagunar de Cananéia–SP (Lat. 25°00'S – Long. 47°55'W). **Boletim do Instituto de pesca**, v. 22, n. 1, p. 1-22, 2018.

RAO, J. V., **Effects of monocrotophos and its analogs in acetylcholinesterase activity's inhibition and its pattern of recovery on euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus***. Toxicology Unit, Biology Division, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad 500, 2007.

RUSCONI, M., *et al.*, Evolutionary toxicology as a tool to assess the ecotoxicological risk in freshwater ecosystems. **Water**, v. 10, n. 4, p. 490-519, 2018.

SAEG, Sistema para análises estatísticas e genéticas. **Versão 8.1**. Fundação Arthur Bernardes, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1999.

SAINT-PAUL, U., Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

SANDSTRÖM, O., Incomplete recovery in a coastal community of fish exposed to a modernized Swedish milled kraft mill. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 51, n.10, p. 2195-2202, 1994.

SANTIN, M., *et al.*, Aspectos da dieta de larvas de *Astyanax janeiroensis* (Eigenmann,1908) (Osteichthyes, Characidae) no reservatório de Guaricana, Rio Arraial, Estado do Paraná. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, p. 73-80, 2005.

SANTOS, D. C. M., *et al.*, Histological alterations in liver and testis of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. **Revista Ceres**, v. 62, n. 2, p. 133-141. 2015.

SANTOS, J. E., *et al.*, Reproductive biology of the Neotropical catfish *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes: Pimelodidae), with anatomical and morphometric analysis of gonadal tissues. **Animal Reproduction Science**, v. 29, n. 1, p. 106-133, 2019.

SANTOS, M. A. S., A Cadeia Produtiva da pesca artesanal no Estado do Pará: estudo de caso no Nordeste Paraense. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, 2005.

SARIKAYA, R.; SELVI, M.; ERKOÇ, F., Investigation of acute toxicity of fenitrothion on peppered corydoras (*Corydoras paleatus*) (Jenyns, 1842). **Chemosphere**, v. 56, n. 7, p. 697-700, 2004.

SARMENTO, E. O., Biossegurança e Experimentação Animal. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 36. p. 09-15, 2005.

SCHAEFER, C. H., *et al.*, The accumulation and elimination of diflubenzuron by fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 249-254, 1979.

SCHALCH, H. C. S., *et al.*, Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887 (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infestados. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 297-302, 2005.

SCHULZ, R. W., *et al.*, Sertoli cell proliferation in the adult testis - evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 891-898, 2005.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A., The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, v. 68, v. 4, p. 369-392, 2004.

SHIMIZU, A., Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of its annual reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 310-324, 2003.

SILVA FILHO, P. B., **Efeitos do Roundup™ e do Thiodan® em adultos de *Astyanax bimaculatus* (Characidae: Teleostei): Valores de CL₅₀ e morfologia testicular**. 2010. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

SILVA, E., *et al.*, Assessment of essential elements and chemical contaminants in thirteen fish species from the Bay Aratu, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 871-877, 2016.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O., Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SLOMAN, K. A., *et al.*, Socially-induced changes in sodium regulation affect the uptake of water-borne copper and silver in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 135, n. 4, p. 393–403. 2003.

SLOMAN, K. A.; ARMSTRONG, J. D., Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artifacts or natural phenomena. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n.1, p. 1-23, 2002.

SLOMAN, K. A., *et al.*, The effect of social stress on the metabolic rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 49–53, 2000.

SOARES, P. R. L., *et al.*, Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, v. 161, p. 412-421, 2016.

SOUZA, J. P., **Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento**. 2008, 78p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

STEVENS, K. C.; PEREIRA, R. M.; KOEHLER, P. G., Mosquitocidal Chips Containing the Insect Growth Regulator Pyriproxyfen for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 12, p. 2152, 2019.

SUGANTHI, P., *et al.*, Haemato-immunological studies in ZnO and TiO₂ nanoparticles exposed euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 66, p. 55-61, 2019.

SUN, C., *et al.* Isolation and complete genome sequence of *Algibacter alginolytica* sp. nov., a novel seaweed-degrading Bacteroidetes bacterium with diverse putative polysaccharide utilization loci. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 10, p. 2975-2987, 2015.

SVOBODA, M., *et al.*, The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Veterinaria Brno**, v. 70, n. 4, p. 457-465, 2001.

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://aquanec.org/publicat/state/il-in/as-503.htm>> Acessado em 23 de maio de 2019.

TANG, K. N., *et al.*, Safety and efficacy of milbemycin oxime and lufenuron to treat *argulus* spp. infestation in Smooth back river stingrays (*Potamotrygon orbignyi*) and Magdalena river stingrays (*Potamotrygon magdalenae*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 50, n. 2, p. 383-388, 2019.

TAVARES-DIAS, M., *et al.* **Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun x O. mossambicus* under intensive rearing.** In: Proceedings International Symposium on Tilapia Aquaculture, 5, 2000, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro : Fitzmmons, K., Carvalho Filhos, J. (Ed.), p. 533-541. 2000.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIN, E. F. S., Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 2, p. 151-155, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA-JÚNIOR, A. A.; MARCON, J. L., Methodological limitations of counting total leukocytes and thrombocytes in reptiles (Amazon turtle, *Podocnemis expansa*): an analysis and discussion. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 2, p. 351-356, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R., **Hematologia de peixes teleósteos**. 1.ed. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004. 144p.

TUNDISI, J. G., *et al.*, Limnologia de águas interiores: impactos, conservação e recuperação de ecossistemas aquáticos. **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**, v. 3, n. 1, p. 203-240, 2006.

TURRA, A., *et al.*, Environmental impact assessment under an ecosystem approach: the São Sebastião harbor expansion project. **Ambiente & Sociedade**, v. 20, n. 3, p. 155-176, 2017.

URIBE, M. C.; GRIER, H. J.; MEJÍA-ROA, V., Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 3, p. 983-1000, 2014.

VÁCHA, J., **Problém normálnosti v biologii a lékařství**. Praha, Avicenum. 1980. 177p.

VAMOSI, S. M.; SCHLUTER, D., Impacts of trout predation on fitness of sympatric sticklebacks and their hybrids. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1, p. 923–930, 2002.

VAN GESTEL, C. A. M., Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. **Zookeys**, v. 176, p. 275–296, 2012.

VÁZQUEZ, G. R.; MEIJIDE, F. J.; NOSTRO, F. L., Recovery of the reproductive capability following exposure to 4-tert-octylphenol in the neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 5, p. 585-590, 2016.

VITULE, J. R. S.; ARANHA, J. M. R., Ecologia alimentar do lambari, *Deuterodon langei* Travassos, 1957 (Characidae, Tetragonopterinae), de diferentes tamanhos em um riacho da Floresta Atlântica, Paraná (Brasil). **Acta Biológica Paranaense**, v. 31, n. 4, p. 137-150. 2002.

WAHRLICH, V.; ANJOS, L. A., Historical and methodological aspects of the measurement and prediction of basal metabolic rate: a review. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 4, p. 801-817, 2001.

YHASMINE, W., Cypermethrin toxic effect on enzyme activities in freshwater fish (*Cyprinus carpio*). **Advanced Marine Aquarium Techniques**, v. 1, n. 9, p. 94-97, 2013.

YOLBAS, S., *et al.*, Hematological indices may be useful in the diagnosis of systemic lupus erythematosus and in determining disease activity in Behçet's disease. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 6, p. 510-516, 2016.

YOSHIDA, C. E., *et al.*, Chave de identificação dos peixes de riachos da Serra do Japi (Apas Jundiá-Cabreúva/SP). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 4, p. 800-815, 2018.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E., **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2008. 486 p.

ZAIDI, N.; FARINE, J. P.; SOLTANI, N., Experimental study on diflubenzuron: degradation in freshwater and bioconcentration in mosquitofish following chronic exposure. **Journal of Environmental Protection**, v. 4, n. 2, p. 188-194, 2013.