

MILA VASQUES LEANDRO

**DESCRIÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA DO OVÁRIO DO
PEIXE *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei:
Characidae) E EFEITOS DO INSETICIDA DIFLUBENZURON NA
MORFOLOGIA OVARIANA**

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

VIÇOSA,
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L437d
2014
Leandro, Mila Vasques, 1988-
Descrição morfo-histológica do ovário do peixe
Hyphessobrycon eques (Steindachner, 1882) (Teleostei:
Characidae) e efeitos do inseticida diflubenzuron na morfologia
ovariana / Mila Vasques Leandro. – Viçosa, MG, 2014.
xiii, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamim.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 40-46.

1. Peixe - Morfologia - Ovários. 2. *Hyphessobrycon eques*.
3. Histopatologia. 4. Inseticida - Toxicologia. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

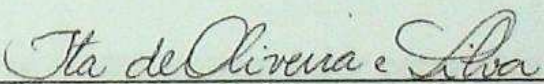
CDD 22. ed. 597.48

MILA VASQUES LEANDRO

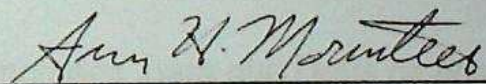
**DESCRIÇÃO MORFO-HISTOLÓGICA DO OVÁRIO DO
PEIXE *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei:
Characidae) E EFEITOS DO INSETICIDA DIFLUBENZURON NA
MORFOLOGIA OVARIANA**

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

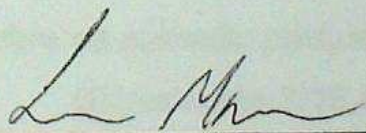
APROVADA: 18 de dezembro de 2014.



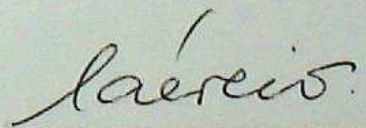
Ita de Oliveira e Silva
(Coorientadora)



Ann Honor Munteer
(Coorientadora)



Lucas Marcon



Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

Disse ainda comigo: é por causa dos filhos dos homens, para que Deus os prove, e eles vejam que são em si mesmos como os animais. Porque o que sucede aos filhos dos homens sucede aos animais; o mesmo lhes sucede: como morre um, assim morre o outro, todos têm o mesmo fôlego de vida, e nenhuma vantagem tem o homem sobre os animais; porque tudo é vaidade”.

(Eclesiastes 3:18,19)

A Deus, que é “a minha fortaleza e a
minha força e perfeitamente desembaraça
o meu caminho”, dedico.

(2 Samuel 22:33)

Em memória do amigo Marcos Leôncio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo cuidado diário comigo e por ter colocado pessoas tão especiais na minha vida.

À minha mãe (Beth), ao meu pai (Mauri), à minha irmã (Mara) e ao meu primo (Arleu), por todo apoio e força que me transmitiram nesse período.

Ao Arthur, que mesmo de longe se fez e faz mais que presente na minha vida, agradeço pela força, carinho e amor e por me fazer sorrir nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Laércio dos Anjos Benjamin, por ter me recebido e por todos os ensinamentos transmitidos, tanto na área profissional como na área pessoal. Agradeço pela sua paciência em ensinar e por ser um exemplo como profissional dedicado.

À minha co-orientadora Profa. Ann Honor Munteer, pelas colaborações e sugestões e pelos conhecimentos em Ecotoxicologia transmitidos.

À minha co-orientadora Profa. Ita de Oliveira e Silva, por toda a ajuda no meu começo em Viçosa e por sempre se mostrar disposta em ajudar.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade e pelas valiosas sugestões e críticas, contribuindo para este trabalho.

À amiga Amara Goulart, por ter-me apresentado ao professor Laércio e por toda ajuda e suporte, tanto para conseguir república para morar, como no ingresso no mestrado e pela ajuda em quase todas as fases. Agradeço pela amizade, pela força emocional e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos amigos Diego Senra, pela ajuda em quase todas as etapas, pelo companheirismo e amizade, e Fausto Ferraz, pela amizade desde a graduação, por sempre estar disposto a ajudar e por ter-me dado tanta força no momento em que decidi me mudar para Viçosa.

Aos amigos Lucas Marcon e Paulo Burlamaqui, por sempre estarem dispostos a ajudar (de perto ou de longe), agradeço pela paciência e conhecimento transmitido.

Aos amigos da pós-graduação e companheiros de trabalho: Giselle Dias, Polyana Galvão (pela ajuda, em especial na época do REUNI), Wendeo Silveira (pelas boas conversas), Sanely Costa (por ser tão especial, agradeço pelas conversas e conselhos) e Luan Ritchelle (pela disposição e dedicação).

Aos grandes amigos Elisabeth Toledo e Vinícius Santos, pela ajuda com a estatística, pela amizade, conselhos, almoços e conversas com Deus.

À secretária da Pós-graduação Rosi, por ser tão prestativa e dedicada.

Aos amigos macacólogos Alba Zilocchi, Talitha Mayumi, Daniel Ferraz e ao amigo cachorrólogo Edilberto Martinez, por todo apoio no meu começo em Viçosa.

BIOGRAFIA

Mila Vasques Leandro, filha de Elizabeth Cheregate Vasques Leandro e Mauri Leandro, nasceu na cidade de Muriaé/Minas Gerais, em 19 de abril de 1988.

Em dezembro de 2002 concluiu o Ensino Fundamental pela Escola Estadual Geraldo Rocha, em Antônio Prado de Minas/MG.

Em dezembro de 2005 concluiu o Ensino Médio pela Escola Estadual Américo Lopes, em Eugenópolis/MG.

Sua carreira acadêmica começou em 2007 quando ingressou na graduação em Ciências Biológicas, pela FAFISM (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras “Santa Marcelina”), colando grau em 2009.

Em fevereiro de 2012, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, defendendo a dissertação em dezembro de 2014.

No momento, atua como professora na rede estadual de ensino no Estado do Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Ecotoxicologia	2
2.2. Diflubenzuron	4
2.3. O uso do diflubenzuron na piscicultura	7
2.4. <i>Hyphessobrycon eques</i>	9
2.5. Anatomia ovariana e desenvolvimento folicular de teleósteos	10
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Normas de conduta para o uso de animais na pesquisa	14
4.2. Animais	14
4.3. Testes toxicológicos	14
4.4. Análise de água	15
4.5. Coleta de amostras e processamento para estudo histológico	16
4.6. Análise histológica	17
4.7. Análise estatística	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1. Análise de água	18
5.2. Dados biométricos do <i>H. eques</i>	20
5.3. O ovário do <i>H. eques</i>	21
5.4. Desenvolvimento folicular do <i>H. eques</i>	23
5.4.1. Desenvolvimento folicular primário e secundário	23
5.4.1. 1. Desenvolvimento folicular primário inicial	23
5.4.1. 2. Desenvolvimento folicular primário avançado	24
5.4.1. 3. Desenvolvimento folicular secundário inicial	24
5.4.1. 4. Desenvolvimento folicular secundário intermediário	25
5.4.1. 5. Desenvolvimento folicular secundário avançado	28
5.4.2. Folículos pós-ovulatórios	29
5.4.3. Folículos atrésicos	30

5.5. Efeitos do diflubenzuron no desenvolvimento dos folículos ovarianos	32
5.5.1. Diâmetro dos folículos	32
5.5.2. Quantificação dos folículos	34
5.5.3. Percentual dos diferentes estádios de desenvolvimento folicular	37
6. CONCLUSÕES	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

LEANDRO, Mila Vasques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Descrição morfo-histológica do ovário do peixe *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae) e efeitos do inseticida diflubenzuron na morfologia ovariana.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadoras: Ann Honor Mounteer e Ita de Oliveira e Silva.

O uso indiscriminado de agrotóxicos em pisciculturas pode causar efeitos negativos nos peixes. O inseticida diflubenzuron (Dimilin[®]) vem sendo utilizado em pisciculturas no controle de ectoparasitas desses animais. Devido à carência de estudos sobre os seus efeitos subletais, objetivou-se descrever a anatomia ovariana de fêmeas maduras do peixe *Hyphessobrycon eques*, bem como avaliar os ovários após exposição ao diflubenzuron. Os testes de toxicidade seguiram as normas técnicas de testes em sistema estático da ABNT. Foram utilizados um grupo controle e três grupos com concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de Dimilin[®], em um teste de 96h e um teste de 17 dias. Para o teste de 96h foi utilizada uma única aplicação no início do experimento; para o teste de 17 dias foram utilizadas duas aplicações (no início do experimento e 72h após a primeira aplicação). Amostras de água dos aquários foram coletadas para análises físico-químicas. Ovários de 10 animais de cada grupo, de cada teste realizado, foram coletados para estudo histológico de rotina. Foram realizadas contagens de folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento, de folículos atrésicos e de folículos pós-ovulatórios em todo o corte do ovário. Também foram feitas medidas dos diâmetros de 25 folículos em cada estágio de desenvolvimento, em cada concentração de cada teste (de 96h e de 17 dias) para se avaliar a ocorrência de possíveis alterações. Foram descritos os folículos ovarianos em seus diferentes estádios de desenvolvimento, bem como o ovário. A análise de água mostrou que os parâmetros se encontravam dentro de valores desejáveis para a criação de peixes. Os ovários maduros dos *Hyphessobrycon eques*, aparentemente, apresentaram-se como uma única estrutura, possuindo uma concavidade em sua porção dorsal e ventral, que dão abrigo à bexiga natatória e aos órgãos do aparelho digestório, respectivamente. Eles, *in natura*, possuem um aspecto frouxo, se desintegrando facilmente com a manipulação. O desenvolvimento dos folículos é assincrônico e mostraram estádios de desenvolvimento com características gerais comuns aos demais teleósteos, com

um desenvolvimento primário, que foi subdividido em dois estádios, e um desenvolvimento secundário que foi subdividido em três estádios. Não foi observada nenhuma alteração morfológica nos folículos após exposição ao diflubenzuron nas concentrações estabelecidas. De acordo com os resultados apresentados para o diâmetro dos folículos e para a quantificação dos folículos, pode-se inferir que não foram observados efeitos subletais do diflubenzuron nos ovários de *H. eques*, provavelmente pelas concentrações utilizadas e duração dos experimentos. Como o produto não foi desenvolvido para uso veterinário e não existe um protocolo de uso para este fim, os piscicultores ao utilizarem quantidades maiores, podem induzir a ocorrência de danos aos animais.

ABSTRACT

LEANDRO, Mila Vasques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december 2014. **Morphohistological description of the ovary of fish *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae) and the effects of the insecticide diflubenzuron on ovarian morphology.** Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-adviser: Ann Honor Munteer and Ita de Oliveira e Silva.

The indiscriminate use of pesticides in fish farms can cause adverse effects in fish. The insecticide diflubenzuron (Dimilin[®]) has been used in fish farms in the control of ectoparasites of these animals. Due to the lack of studies on its sublethal effects, this study will describe the ovarian anatomy of mature female fish *Hyphessobrycon eques* and evaluate the ovaries after exposure to diflubenzuron. Toxicity tests followed the ABNT static system technical standards tests. We used a control group and three groups with concentrations of 0.01, 0.1 and 1.0mg.L⁻¹ Dimilin[®], 96h and a 17-day test. For 96h test was used a single application at the beginning of the experiment; for 17 days two applications were used (at the beginning of the test and 72 hours after the first application). Water samples were collected for the aquarium physicochemical analyzes. In each test performed, the ovaries of 10 animals per group were collected for routine histological examination. Were performed counts of ovarian follicles at different developmental stages, atretic follicles and post-ovulatory follicles throughout the ovary. Moreover, measurements of the diameters of 25 follicles were made at each stage of development, at each concentration test (of 96h and 17 days) to evaluate the occurrence of possible changes. The ovary and ovarian follicles were described in their different stages of development. Water analysis showed that the parameters were within desirable values for fish farming. Mature ovaries of *Hyphessobrycon eques* are presented as a single structure having a concavity in the dorsal and ventral portion, which provide shelter to the swim bladder and the organs of the digestive system, respectively. The ovaries, *in nature*, have a loose appearance, easily disintegrating with handling. The development of the follicles is asynchronous and showed developmental stages with general characteristics common to other teleosts, with a primary development, which was divided in two stages, and a secondary development that was divided into three stages. There has been no morphological changes in the follicles following exposure to diflubenzuron in the established concentrations. According to the results presented

for the diameter of the follicles and the follicles quantifying, it can be inferred that the sublethal effects of the diflubenzuron were not observed in *H. eques* ovaries, probably because the concentrations used and duration of the experiments. Since the product is not intended for veterinary use, and there is no protocol for this purpose, farmers utilizing larger quantities may bring damage to the animals.

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura vem ganhando cada vez mais espaço na economia. De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura, a produção de peixes pelas pisciculturas em 2005 foi de cerca de 170t e em 2010 foi de cerca de 479t. Com esse crescimento, acabam surgindo problemas com a criação intensiva de peixes, pois esta torna os peixes mais susceptíveis a enfermidades, devido, principalmente, a altas densidades, estresse e má qualidade da água. Diante do exposto, as doenças parasitárias em peixes representam um sério problema para as pisciculturas.

Com a falta de produtos específicos para o controle de ectoparasitas em peixes, os agrotóxicos, que têm formulações próprias para agricultura, acabam sendo usados indiscriminadamente. O diflubenzuron (DFB), nome comercial Dimilin[®], é um agrotóxico usado para o controle de insetos em plantações e vem sendo amplamente utilizado no Brasil para o controle de ectoparasitas de peixes (tanto na água, como na ração), pois inibe a síntese da quitina, o principal componente do exoesqueleto dos artrópodes.

O DFB foi caracterizado como possuindo baixa toxicidade para vertebrados. Entretanto, pode ocorrer acumulação desse produto em peixes e dois de seus metabólitos (4-cloroanilina e a 4-clorofenilureia) são altamente tóxicos e classificados como prováveis carcinógenos para humanos. A maioria dos estudos relacionados ao uso do diflubenzuron em pisciculturas inclui a determinação da CL₅₀ do inseticida ou a eficácia do produto no controle de ectoparasitas. Entretanto, não há muitos estudos sobre os efeitos subletais do DFB em peixes.

Portanto, mais estudos são necessários para ampliar o conhecimento sobre os efeitos de compostos terapêuticos na saúde dos peixes e para melhor definir o uso seguro do DFB em pisciculturas. O uso de parâmetros histológicos, como biomarcadores, tem apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos dos xenobióticos sobre os peixes.

Hyphessobrycon eques, um peixe de ampla distribuição geográfica (desde a bacia do rio da Prata até a bacia Amazônica), de fácil criação em cativeiro, e amplamente distribuído no comércio de peixes ornamentais, se faz um bom instrumento de pesquisa para os possíveis efeitos desse inseticida, pois pode sofrer bioacumulação, constituindo um potencial bioindicador.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ecotoxicologia

Desde a década de 1950 vem ocorrendo um aumento no número e na quantidade de produtos químicos e pesticidas utilizados pela nossa sociedade. Com a crescente contaminação do meio ambiente, a necessidade de determinar os efeitos desses produtos também aumentou, tendo sido desenvolvidos vários métodos para tanto (Fericola et al., 2003; Hanratty e Liber, 1996).

A toxicologia é a ciência que estuda as ações e os efeitos nocivos de substâncias químicas, quase sempre de origem antrópica, sobre organismos vivos (Costa et al., 2008; Chasin e Pedroza, 2003). Por meio de análises químicas, as substâncias tóxicas podem ser identificadas e quantificadas. Já os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos, utilizando ensaios laboratoriais em que organismos são expostos a diferentes concentrações das mesmas e os efeitos produzidos sobre eles são observados e quantificados (Costa et al., 2008). Contudo, é necessária a combinação desses dois métodos (as análises químicas e os testes de toxicidade) para uma boa avaliação (Hecker e Hollert, 2009).

A ecotoxicologia surgiu como uma área especializada da toxicologia, com a função de avaliar os efeitos de substâncias tóxicas sobre sistemas ecológicos, utilizando características metodológicas da toxicologia como testes laboratoriais padronizados com espécie padrão e metodologias de avaliação de risco (Flynn e Pereira, 2011; Costa et al., 2008; Preston, 2002). A ecotoxicologia é baseada em conceitos fundamentais da ecologia, que visa entender as relações entre os organismos vivos e seu ambiente (Boudou e Ribeyre, 1997).

Os termos ecotoxicologia e toxicologia ambiental são algumas vezes usados como sinônimos, mas há uma tendência para usar o termo toxicologia ambiental somente para os estudos dos efeitos dos agentes químicos do ambiente sobre os seres humanos (Costa et al., 2008; Chasin e Pedroza, 2003).

As informações obtidas por meio de estudos ecotoxicológicos são essenciais para determinar as concentrações de contaminantes no ambiente, estimar o grau de periculosidade dos contaminantes, indicar níveis máximos permitidos de contaminantes e controlar a sua emissão, diagnosticar e prognosticar o efeito dos

contaminantes no ambiente, e avaliar os riscos ecológicos (Costa et al., 2008; Fernicola et al., 2003).

Os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptores de poluentes e várias são as causas e formas de propagação dessas contaminações, como derramamentos ou descargas de resíduos, percolação ou lixiviação de contaminantes para o lençol freático, ou precipitação direta de poluentes do ar (Costa et al., 2008; Arias et al., 2007; Goulart e Callisto, 2003; Handy, 1994). Por isso, os testes de toxicidade aquática são muito utilizados (Costa et al., 2008), pois a contaminação do ambiente por quantidades elevadas de produtos químicos vem causando muita preocupação, com efeitos regionais e até mesmo globais (Schmitt-Jansen et al., 2008).

Entretanto, a atividade biológica, as estimativas de toxicidade e o impacto dos agentes químicos, podem ser afetados significativamente pelas propriedades físicas e químicas dos ecossistemas aquáticos e pelas condições ambientais, sendo necessário o desenvolvimento de métodos de ajuste e uma compreensão mais ampla destas interações para enfrentar estes desafios (Fernicola et al., 2003; Preston, 2002).

No ecossistema aquático, a contaminação dos organismos vivos, independente da sua complexidade biológica ou sua posição na cadeia alimentar, depende da biodisponibilidade dos agentes tóxicos (Boudou e Ribeyre, 1997). Contaminantes solúveis em água e contaminantes adsorvidos em partículas e sedimentos (à medida que vão sendo associados à água) são incorporados pelos organismos aquáticos por meio da exposição dérmica e pelos tecidos respiratórios. Contaminantes presentes nos alimentos podem também ser ingeridos e absorvidos pelo tubo gastrointestinal (Costa et al., 2008).

Quando absorvidos em grandes quantidades, os contaminantes podem ser acumulados nos organismos e provocar efeitos deletérios. A bioacumulação é o processo pelo qual um contaminante é absorvido do meio externo por um organismo, sendo as concentrações absorvidas muito maiores do que aquelas encontradas no meio (Fernicola et al., 2003). Já a biomagnificação é o aumento da concentração de contaminantes nos tecidos à medida que se avança nos níveis tróficos, resultante principalmente da acumulação ocasionada pela dieta alimentar (Costa et al., 2008; Fernicola et al., 2003).

Os bioindicadores são organismos vivos que podem refletir as condições do meio ambiente em que vivem, indicando os primeiros sinais de estresse ambiental (Adams, 2002); já os biomarcadores são as alterações biológicas mensuráveis desses organismos que podem determinar os efeitos de xenobióticos presentes no ambiente (Walker et al., 1996).

Diversas espécies de peixes podem ser usadas como bioindicadores de ambientes aquáticos (Goulart e Callisto, 2003), pois podem ser observados vários efeitos bioquímicos, fisiológicos e histológicos provocados nestes animais pela exposição a agentes tóxicos, como modificações na permeabilidade das membranas celulares, interferência no anabolismo e catabolismo, inibição reversível ou irreversível de enzimas que podem resultar em alterações hepáticas ou afetar a síntese e liberação de hormônios, comprometimento do crescimento e/ou capacidade reprodutiva, e alterações nos sistemas enzimáticos microssomais responsáveis pela biotransformação de xenobióticos (Costa et al., 2008; Arias et al., 2007).

2.2. Diflubenzuron

Os principais grupos de inseticidas são os organoclorados e os piretróides, que atuam desestabilizando as membranas das células nervosas; os organofosforados, que interferem no sistema nervoso, por meio da inibição da colinesterase, que media os impulsos nervosos; os carbamatos, que apresentam um mecanismo de ação semelhante ao dos organofosforados; e os reguladores do crescimento de insetos (Faria, 2009; Cloyd, 1999).

Os reguladores do crescimento de insetos são largamente utilizados para controlar uma variedade de pragas por meio da interferência no crescimento e/ou desenvolvimento desses animais (Merzendorfer et al., 2012). Apresentam vantagens por possuírem toxicidade relativamente baixa para vertebrados e atuarem basicamente sobre as pragas alvo (Castro et al., 2012; Merzendorfer et al., 2012; Tiwari et al., 2012).

As principais categorias desses reguladores se distinguem pelo seu modo de ação, dividindo-se em dois grupos: hormonais e não hormonais (Merzendorfer et al., 2012; Eisler, 1992). Dentre os hormonais, podem ser citados os ecdisteroides, que

são agonistas de ecdinosa de insetos (tebufenozide ou metoxifenozide) e induzem as larvas a entrarem em um ciclo de muda prematuro e letal; e os juvenoides, substâncias análogas aos hormônios juvenis (fenoxicarbe, metopreno, piriproxifem) que afetam a ação de hormônios reguladores do crescimento (Merzendorfer et al., 2012; Kim et al., 2002). Os reguladores não hormonais são as benzofenilureias (fluazuron, diflubenzuron, triflumuron, exaflumuron e o lufenuron), que agem sobre a formação do exoesqueleto de artrópodes (Merzendorfer et al., 2012).

Embora esses inseticidas sejam de extrema importância para a agricultura, tem havido uma crescente preocupação entre os ambientalistas, uma vez que podem oferecer riscos a artrópodes não alvo e ecologicamente importantes, causando reduções muitas vezes irreversíveis nas populações, afetando com isso todo um ecossistema (Castro et al., 2012; Gartenstein et al., 2006; Eisler, 1992).

O diflubenzuron (DFB), nome comercial Dimilin[®], é um inseticida que pertence ao grupo das benzoilfenilureias, de nome químico 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)ureia, N-[[[(4-clorofenil)amino]carbonil]-2,6-difluorobenzamida ou 1-(2,6-difluorobenzoil)-3-(4-clorofenil)ureia (Eisler, 1992), que age evitando a formação de estruturas quitinosas nos insetos, inibindo a síntese de quitina, o principal componente do exoesqueleto dos artrópodes e interrompendo o processo de muda, ou a formação de cutícula durante estádios específicos do desenvolvimento, levando-os à morte (Castro et al., 2012; Merzendorfer et al., 2012; Tiwari et al., 2012; Kim et al., 2002; Eisler, 1992; Guyer e Neumann, 1988). Tem sido largamente utilizado para controle de artrópodes de diversas classes, principalmente na agricultura comercial (Kim, 2002; Gartenstein et al., 2006; Eisler, 1992). Entre as espécies de artrópodes, há grande variabilidade na sensibilidade ao DFB. Insetos e crustáceos são os grupos mais afetados, agindo especialmente nas larvas (Eisler, 1992).

A mobilidade (capacidade de migração de um elemento dentro de um espaço, de passar de uma forma química a outra ou de mudança de fase) e lixiviabilidade (capacidade de transferências de contaminantes do resíduo para a solução lixiviante) do DFB em solos são baixas, e os resíduos geralmente não são detectáveis após sete dias. Na água, normalmente, persiste por no máximo oito dias em altas temperaturas e pH elevado, sendo a degradação mais rápida sob condições de altas cargas orgânicas e sedimentos (Eisler, 1992). Por exemplo, a

persistência do diflubenzuron na água com pH 7,7 é de 8 dias a 38°C; 35 dias a 24°C e 29 dias a 10°C. Em pH 10, os valores são de 2 dias a 38°C; 14 dias a 24°C e 32 dias a 10°C. A degradação é insignificante a um pH 4 e a baixas temperaturas, independente do pH (Eisler, 1992).

Nos processos de hidrólise, degradação do solo e metabolismo de plantas e animais ocorre a produção dos mesmos produtos iniciais (ácido 2,6-difluorobenzoico e 4-clorofenilureia). A degradação do solo e o metabolismo animal e vegetal envolvem a conversão adicional destes compostos em 2,6-difluorobenzamida e 4-cloroanilina (Eisler, 1992) (Figura 1).

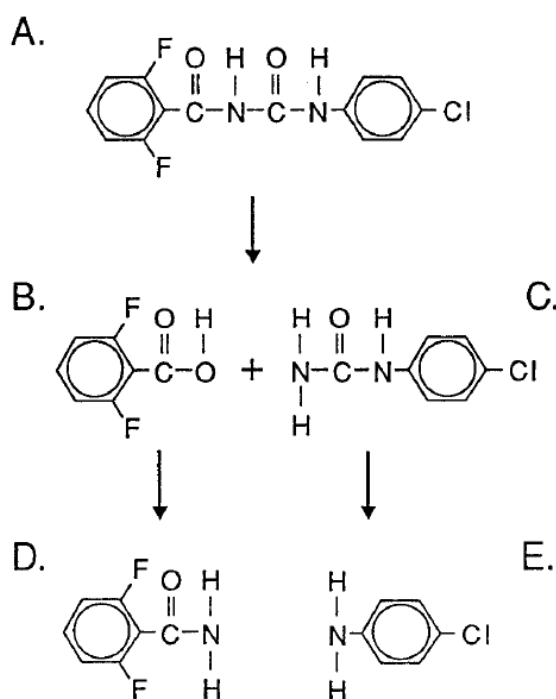


Figura 1. Modelo de degradação do diflubenzuron. O diflubenzuron (A) degrada-se formando ácido 2,6-difluorobenzoico (B) e 4-clorofenilureia (C). O ácido 2,6-difluorobenzoico é convertido em 2,6-difluorobenzamida (D) e a 4-clorofenilureia é convertida em 4-cloroanilina (E) (Eisler, 1992).

Embora o DFB seja um produto considerado com baixa toxicidade para vertebrados, os metabólitos 4-cloroanilina e 4-clorofenilureia mostram alta toxicidade para peixes (Maduenho e Martinez, 2008; Fisher e Hall, 1992). A 4-cloroanilina foi classificada pelo Programa Nacional de Toxicologia da Agência de Proteção Ambiental dos EUA - EPA (2006) como mutagênica e provável carcinógeno humano, além de muito tóxica (Vicente e Toledo, 2003). Por causa da sua relevância toxicológica, a 4-cloroanilina foi incluída pela Comunidade Europeia na lista de poluentes industriais que devem ser monitorados na água (Coquart e Hennion,

1993). Seus principais efeitos estão associados à formação de meta-hemoglobina e tumores no fígado e baço de camundongos, além de osteossarcoma (FAN, 2010; Vicente e Toledo, 2003).

2.3. O uso do diflubenzuron na piscicultura

A piscicultura é uma importante atividade econômica no Brasil e vem crescendo nos últimos anos. Com a piscicultura ganhando cada vez mais espaço na economia, a criação intensiva tornou os peixes mais susceptíveis a enfermidades, devido, principalmente, a altas densidades, estresse e má qualidade da água; favorecendo a proliferação de organismos patogênicos (Schalch et al., 2009).

Os artrópodes parasitas de peixes são registrados desde os tempos de Aristóteles (300 aC). Cerca de 2000 espécies de artrópodes parasitas têm sido descritos, e a maioria pertence à classe Copepoda (Lester e Hayward, 2006). Crustáceos parasitas de peixes incluem copépodes, braquiúros e isópodes. Parasitam o tegumento, nadadeiras, brânquias e boca de peixes selvagens e cultivados, causando danos à saúde dos animais e prejuízos econômicos (Wall, 2008; Harms, 1996). No Brasil, *Lernaea cyprinacea* é a espécie mais comum, tendo sido propagada com rapidez, e já ocorre em quase todo o país (Tavares-Dias et al. 2011).

Produtos químicos são amplamente utilizados para o controle de ectoparasitas, sendo praticamente a primeira estratégia para o combate destes em peixes. No entanto, a falta de informações e de produtos químicos específicos para a aquicultura, leva ao uso indiscriminado de agrotóxicos que têm formulações próprias para agricultura (Maduenho e Martinez, 2008).

Os organofosforados já foram muito utilizados para o controle de ectoparasitas. Porém, seu uso tem alto grau de toxicidade para os peixes, para o ambiente e para o aplicador do produto. Já os inibidores da síntese de quitina, como o DFB, vêm sendo amplamente utilizados para esses tratamentos por serem considerados pouco tóxicos para peixes (Castro et al., 2012; Johnson, 2006; Harms, 1996).

O DFB tem sido frequentemente usado em pisciculturas com eficácia nas concentrações que variam de 0,01 a 2mg.L⁻¹ (Schalch et al., 2005; Fujimoto et al., 1999; Kubitzka et al., 1999; Post, 1987).

Schalch et al. (2005), utilizando banhos terapêuticos de DFB na concentração de 2mg.L^{-1} , para *Piaractus mesopotamicus* infestados por *Dolops carvalhoi*, constataram eficácia de 97,2%. Já Fujimoto et al. (1999), utilizando banhos terapêuticos de 0,5 e 1mg.L^{-1} do inseticida, para *Leporinus macrocephalus* infestados por crustáceos copépodes ectoparasitas, observaram eficácia de 100%.

De acordo com Post (1987), a dose de $0,01\text{mg.L}^{-1}$ de Dimilin[®] é a recomendada para o tratamento da lerneose. Burtle e Morrison (1987), aplicando uma dose de 10 ou $30\mu\text{g/L}$ de Dimilin[®] em tanques do peixe *Notemigonus crysoleucas* infestados pela *Lernaea cyprinacea*, observaram que foi reduzida significativamente a infestação parasitária quatro a oito dias após o tratamento (não observando diferença significativa entre as duas dosagens), essa redução permaneceu por meses nos tanques com $30\mu\text{g/L}$.

O Dimilin[®] também é muito usado no tratamento de piolhos em kinguios na proporção de uma colher de sopa para cada 240L de água. O medicamento deve permanecer na água por 14 dias e ser repetido novamente por mais 14 dias (Altieri, 2006).

O DFB vem sendo utilizado tanto na água como na ração para o tratamento de parasitas em peixes (Maduenho e Martinez, 2008; Harms, 1996). No entanto, não há registros para o uso veterinário na aquicultura (Harms, 1996) e não há formulações específicas deste pesticida para tratamento em peixes (Maduenho e Martinez, 2008).

Estudos com diferentes espécies de peixes têm sido feitos para examinar a toxicidade de DFB, mostrando que a sua concentração média letal para 96h de exposição (CL_{50} 96h) é superior a 50mg.L^{-1} , o que caracteriza o produto como possuindo baixa toxicidade para os peixes (Fisher e Hall, 1992). No entanto, os peixes podem acumular DFB da água (Eisler, 1992; Schaefer, 1979) e dois dos seus metabólitos são altamente tóxicos para peixes (Fisher e Hall, 1992).

Os fatores de bioconcentração do DFB variam de 5mg.L^{-1} para *Oreochromis niloticus* a $0,001\text{-}0,005\text{mg.L}^{-1}$ para *Lepomis macrochirus* (Orne e Kegley, 2007). O DFB pode se acumular em tecidos e órgãos de peixes após a administração na água. O acúmulo pode ser cerca de 40 vezes maior que a concentração inicial (13mg.g^{-1}) no primeiro dia após a aplicação do inseticida, sendo que no músculo o valor é de até 160 vezes a concentração inicial (Schaefer et al., 1980).

A maioria dos estudos relacionados ao efeito do DFB, ou estudo da sua toxicidade, inclui a determinação da CL₅₀ do inseticida para peixes de água fria ou a eficácia do produto no combate de ectoparasitas. De modo geral, há falta de dados sobre os efeitos do pesticida em espécies de peixes de regiões neotropicais e muito pouco se sabe sobre os seus efeitos subletais (Maduenho e Martinez, 2008).

Em um estudo utilizando o peixe *Prochilodus lineatus*, após 6, 24 e 96h de exposição a 25 mg.L⁻¹ de DFB, foram observadas alterações histológicas no fígado, como aumento do volume celular e nuclear, degeneração citoplasmática e nuclear, e estagnação biliar. A exposição aguda ao DFB levou a uma redução no número de eritrócitos e diminuição do teor de hemoglobina, devido à hemólise e hiperglicemia (mobilização de energia) após 96h de exposição. Esses resultados mostram que o DFB pode causar problemas à saúde dos peixes e mais estudos são necessários para melhor definir o seu uso seguro em pisciculturas (Maduenho e Martinez, 2008).

A CL₅₀ calculada para o peixe *Hyphessobrycon eques*, espécie utilizada neste estudo, foi de 22,4 mg.L⁻¹, e o intervalo de confiança obtido pela média móvel foi de 13,9 a 34,8 mg.L⁻¹ (P<0,05), sendo que a concentração de 405 mg.L⁻¹ de Dimilin® foi suficiente para levar à morte todos os peixes em apenas 66h (Goulart, 2012). De acordo com as informações técnicas do produto (CHEMTURA, 2006), no tempo de exposição de 96h para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a CL₅₀ foi de 106,4 mg.L⁻¹, e para o peixe-zebra (*Brachydanio rerio*) foi de 64,8 mg.L⁻¹.

2.4. *Hyphessobrycon eques*

O *Hyphessobrycon eques*, conhecido popularmente como Tetra Serpa ou Mato Grosso, é um peixe neotropical pertencente à família Characidae (Carvalho e Del Claro, 2004). Sua distribuição nas bacias hidrográficas da América do Sul ocorre desde a bacia do rio da Prata (Paraná-Paraguai-Uruguai-Prata) até a bacia Amazônica (Martinez et al., 2012).

São peixes de pequeno porte (Figura 2), apresentando tamanho padrão de 32,0 mm podendo atingir no máximo 58,0 mm (Graça e Pavanelli, 2007). São caracterizados por possuírem cor avermelhada; mancha umeral escura grande e transversalmente alongada; um ponto preto conspícuo dorsal salientado por uma zona branca, amarela ou vermelha; nadadeiras avermelhadas; nadadeira dorsal com

mácula escura e nadadeira anal com extremidade escura; dois a três dentes no maxilar e no máximo seis na fileira interna do pré-maxilar (Hein, 2008). Fazem parte de um complexo de tetras “sanguíneos”, híbridos (Casal, 2010).

Apresentam atividade diurna (Carvalho e Del Claro, 2004), hábito alimentar onívoro, alimentando-se de vermes, crustáceos, insetos e plantas. Encontram-se em ambientes com temperaturas entre 22 e 26°C e, pH entre 5,0 e 7,8 (Casal, 2010). São ovíparos, de fácil produção em cativeiro e de ampla distribuição no comércio de peixes ornamentais (Casal, 2010; Carvalho e Del-Claro, 2004).



Figura 2. Exemplar de *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882).

2.5. Anatomia ovariana e desenvolvimento folicular de teleósteos

Todos os peixes, independente da estratégia reprodutiva, passam por um ciclo semelhante: o desenvolvimento e crescimento dos gametas, desova (liberação dos gametas), cessação da desova, e preparação para a temporada reprodutiva subsequente (Brown-Peterson et al., 2011).

A maioria dos peixes teleósteos possuem dois ovários suspensos dorsalmente no celoma pelo mesovário. Entretanto, em algumas espécies há apenas um órgão, como resultado da fusão de ambos os ovários (Grier et al., 2009). Na sua parte externa, o ovário se encontra envolto por uma túnica albugínea de tecido conjuntivo frouxo, que apresenta espessamentos onde existem vasos sanguíneos que irrigam a gônada (Melo et al., 2014; Valdebenito et al., 2011).

No interior do ovário se observam as lamelas ovulíferas, que se desprendem da albugínea e se projetam para o lume do órgão. O corpo das lamelas é formado

por tecido conjuntivo e escassas fibras musculares lisas (Valdebenito et al., 2011), seu epitélio se torna preenchido por células germinativas e é conhecido como o epitélio germinativo. O epitélio germinativo possui dois tipos de células epiteliais: células somáticas e células germinais dispersas (Grier et al., 2009). Dentro deste epitélio, células germinativas se proliferam e formam as ovogônias, que dentro de cistos entram em meiose, dando origem aos ovócitos. A proliferação e diferenciação das ovogônias forma ninhos (Wildner et al., 2012).

Imediatamente após divisões da ovogônia e a entrada em meiose, os ovócitos estão em contato físico uns com os outros e seu desenvolvimento é bastante sincronizado. No entanto, eles são progressivamente isolados uns dos outros, quando as células pré-foliculares começam a envolver cada ovócito, dando início a foliculogênese (Grier et al., 2009).

O folículo ovariano dos peixes possui uma organização similar em todos os teleósteos. O ovócito é revestido por uma membrana acelular, denominada zona radiata; essa membrana se encontra coberta externamente por células foliculares, as quais, à medida que o ovócito cresce, aumentam em número, distribuindo-se em uma camada contínua de células e, externamente às células foliculares, encontra-se uma camada de células do estroma ovariano, que forma a teca. Estas camadas celulares são separadas por uma membrana basal (Wildner et al., 2012; Valdebenito et al., 2011; Grier et al., 2009; Parenti e Grier, 2004). Juntos, ovócito, células foliculares, membrana basal e teca formam o complexo folicular (Wildner et al., 2012; Valdebenito et al., 2011; Grier et al., 2009; Parenti e Grier, 2004). A formação deste complexo folicular é denominada foliculogênese (Grier et al., 2009). As células foliculares desempenham um papel significativo na vitelogênese e maturação final dos ovócitos na maioria das espécies de teleósteos (Ravaglia e Maggese, 2003).

Durante o crescimento folicular, há dois estádios distintos: crescimento primário e crescimento secundário. O crescimento primário inclui alterações citoplasmáticas e nucleares, além da formação dos alvéolos corticais nos ovócitos. O crescimento secundário é caracterizado pelo rápido acúmulo de gotículas de vitelo no ooplasma e grande aumento no diâmetro do folículo (Melo et al., 2014; Grier et al., 2009). Cada um destes estádios tem sido subdividido em um número variável de estádios de desenvolvimento, levando-se em conta as alterações ocorridas na célula durante todo o seu percurso até ela estar pronta para a ovulação (Grier et al., 2009). Após a

expulsão do ovócito na ovulação, a estrutura restante é denominada folículo pós-ovulatório (FPO), e é constituída por células foliculares, membrana basal e teca, possuindo forma irregular devido à ausência do ovócito (Grier et al., 2009).

A atresia folicular também ocorre nos ovários dos peixes e é um processo degenerativo hormonalmente controlado no qual os folículos perdem a sua integridade e são reabsorvidos antes da ovulação (Santos et al., 2008; Wood e Van Der Kraak, 2001). Neste processo, ocorre a desorganização do núcleo e do citoplasma do ovócito, desintegração da zona radiata, fusão e liquefação dos glóbulos de vitelo e, hipertrofia das células foliculares, que adquirem características fagocíticas para ingestão e digestão do vitelo (Miranda, 1999). Ela desempenha um papel essencial na regulação da fecundidade, reduzindo o número de ovócitos que iriam atingir a ovulação (Grier et al., 2009). A absorção de ovócitos durante a atresia permite a recuperação e reciclagem de seus componentes. Após a desova, ovócitos que não ovularam também se tornam atrésicos (Grier et al., 2009; Santos et al., 2008; Miranda et al., 1999). Entretanto, o aumento da atresia, particularmente em folículos vitelogênicos, pode indicar uma condição patológica (Grier et al., 2009; Santos et al., 2008). Condições ambientais também podem aumentar a incidência de folículos atrésicos, como a nutrição insuficiente e a exposição a contaminantes, resultando em uma diminuição da capacidade reprodutiva (Grier et al., 2009; Santos et al., 2008; Miranda et al., 1999). A atresia folicular também tem sido utilizada como um biomarcador histopatológico para avaliar impacto ambiental (Santos et al., 2008).

Vários fatores físicos e químicos interferem no comportamento e na reprodução dos peixes, como a temperatura, turbidez e nível da água; precipitação, alimentação desequilibrada, presença de xenobióticos, estresse ambiental, fotoperíodo e densidade populacional (Paschoalini et al., 2013). Quando a qualidade do ambiente do animal é alterada, podem ocorrer modificações na estrutura histológica dos folículos, prejudicando a reprodução da espécie.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O diflubenzuron (DFB) é um agrotóxico desenvolvido para o controle de insetos em plantações e está sendo amplamente utilizado em pisciculturas no Brasil para o controle de ectoparasitas de peixes. No entanto, não há registros ou autorização para o uso veterinário na aquicultura, e não há formulações específicas deste pesticida para tratamentos em peixes. Ademais, devido a sua acumulação em peixes, a alta toxicidade dos seus metabólitos (4-cloroanilina e a 4-clorofenilureia) e por não haver estudos sobre os efeitos subletais sobre os peixes, torna-se necessária a realização de estudos para a avaliação dos potenciais efeitos subletais deste produto.

O *Hyphessobrycon eques* é um peixe importante no comércio de ornamentais e para o meio ambiente e pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva das fêmeas das espécies do gênero *Hyphessobrycon*, não sendo encontrado, inclusive, nada na literatura sobre as fêmeas da espécie. Portanto, o estudo da toxicidade do diflubenzuron e seus efeitos na reprodução desta espécie poderão contribuir para uma melhor definição do seu uso seguro em pisciculturas. Além disso, por meio da descrição ovariana, este trabalho também é muito importante para o melhor conhecimento sobre a ecologia do animal.

Objetivo geral

- Determinar os efeitos de diferentes concentrações de diflubenzuron por 96h e 17 dias nas características morfológicas do ovário de *Hyphessobrycon eques*.

Objetivos específicos

- Descrever a anatomia ovariana do *Hyphessobrycon eques*; e
- Avaliar histologicamente os ovários de fêmeas maduras de *H. eques* expostas a diferentes concentrações (0,01; 0,1; e 1,0 mg.L⁻¹) de diflubenzuron em ensaios laboratoriais (96 horas e 17 dias), comparando com ovários de animais do grupo controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Normas de conduta para o uso de animais na pesquisa

Todas as metodologias utilizadas seguiram as normas de bioensaios estabelecidas pelas resoluções do CONAMA (2006) para avaliação da toxicidade de agentes químicos. Todos os procedimentos seguiram as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (protocolo n. 37/2013) e foram realizados e supervisionados pelo Dr. Laércio dos Anjos Benjamin, CRMV-MG 3387.

4.2. Animais

Os exemplares de fêmeas sexualmente maduras de *H. eques* foram obtidos de tanques de cultivo de pisciculturas da região de Muriaé/MG e transportados para o Laboratório de Peixes do Departamento de Veterinária da UFV. Os animais possuíam tamanhos aparentemente semelhantes e foram aclimatados por um período de aproximadamente 15 dias em aquários de 50L, com sistema de aeração contínua, filtro mecânico, fotoperíodo de 12h e troca de água diária inferior a 10% do volume do aquário, temperatura controlada em $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ por meio de termostatos e termômetros, sendo sua aferição realizada duas vezes ao dia quando se disponibilizava a alimentação *ad libitum* para os peixes (ração comercial com 28% de proteína bruta). A água utilizada foi mantida durante 10 dias com aeração contínua antes da aclimação dos peixes nos aquários, visando reduzir o cloro molecular e controlar a temperatura.

4.3. Testes toxicológicos

Os testes foram conduzidos em aquários experimentais de 50L onde o composto diflubenzuron 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)ureia (DFB), nome comercial Dimilin[®] (Chemtura Indústria Química do Brasil Ltda), apresentado na forma de pó para diluição (250g de DFB/Kg de Dimilin[®] em pó), foi aplicado diretamente na água, simulando a aplicação para controle de ectoparasitos em pisciculturas, não havendo renovação da mesma.

Inicialmente foi conduzido um experimento com duração de 96h, utilizando concentrações de 0,01; 0,1; e 1,0 mg.L⁻¹ de Dimilin[®], inferiores a CL₅₀ calculada para a espécie, que foi de 22,4 mg.L⁻¹ (Goulart, 2012), simulando as concentrações utilizadas nos tratamentos de ectoparasitos adotados por pisciculturas (Mabília e Souza, 2006), e um grupo controle, sendo que para cada concentração, mais o grupo controle, foram utilizadas três repetições, totalizando 12 aquários de 50L, com 10 peixes/aquário, com um total de 120 peixes utilizados. Seguindo-se as recomendações para realização de testes de toxicidade aguda, os peixes não foram alimentados durante o período de exposição (ABNT, 2006).

Posteriormente, foi realizado um experimento com duração de 17 dias, para simular as condições de tratamento de ectoparasitas que são realizados nas pisciculturas, utilizando as concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de Dimilin[®] e um grupo controle, com três repetições por concentração (mais o grupo controle), totalizando 12 aquários de 50L, com 10 peixes/aquário, com um total de 120 peixes utilizados. Em cada aquário foram realizadas duas aplicações de Dimilin[®], com as aplicações sendo realizadas no primeiro e quarto dia do experimento (Mabília et al., 2004). Durante a realização do teste, os peixes foram alimentados normalmente (duas vezes ao dia), como ocorre em uma piscicultura.

4.4. Análise da água

A água utilizada para os experimentos era tratada para consumo humano e livre de cloro residual, procedente do DVT/UFV. Antes da aplicação do inseticida na água, coletou-se amostra de água para análise de parâmetros físicoquímicos. Ao término dos experimentos, as amostras de água coletadas para análise consistiram de um pool dos três aquários que constituíam cada repetição. Os parâmetros avaliados foram pH (modelo pHmetro DN21, Digimed, São Paulo), dureza (titulação), oxigênio dissolvido (OD) (titulação iodométrica) e de 5 dias demanda bioquímica de oxigênio, turbidez (turbidimeter modelo 2100AN, Hach, São Paulo) e cloro livre (kit colorimétrico DPD L-1, Hach, São Paulo), de acordo com os procedimentos dispostos no Standard Methods (Eaton et al., 2005). A amônia foi monitorada diariamente no laboratório, juntamente com a temperatura, utilizando um *kit* de teste para aquário modelo Labcon test (Alcon Ltda, Camboriú, SC).

4.5. Coleta de amostras e processamento para estudo histológico

Ao final dos períodos de exposição ao Dimilin[®], dez peixes de cada concentração, mais o grupo controle, de cada experimento, totalizando 80 animais, foram anestesiados em solução de benzocaína 1:10.000 para obtenção de medidas de comprimento total e padrão e peso corporal. O peso foi obtido utilizando balança digital com três casas decimais, e as medidas de comprimento obtidas foram por meio de um paquímetro. Os valores foram apresentados como média±desvio padrão. Na sequência, os peixes foram eutanasiados por secção na transição cabeça-tronco para coleta dos ovários.

Os ovários coletados foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2 por no mínimo 24h. Vinte ovários fixados foram medidos, tendo o comprimento, espessuras e alturas cranial, média e caudal aferidos por meio de paquímetro. Em seguida, os ovários foram lavados e mantidos em álcool 70% para preservação. Após esse processo, os fragmentos foram pré-infiltrados em solução de resina:álcool 1:1, por 12h, em temperatura ambiente, seguido de infiltração em resina pura por 24h, e emblocamento em resina metacrilato. Os ovários foram emblocados em posição longitudinal. Após a polimerização da resina, utilizando estufa a 60°C/24h, as amostras foram fixadas em blocos de madeira para realização da microtomia.

Os fragmentos foram seccionados em cortes semisseriados de 3µm de espessura em micrótomo rotativo Leica RM2155 dotado de navalha de vidro. Os corantes utilizados foram hematoxilina-eosina. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck). As secções histológicas foram examinadas em toda a sua extensão para a realização da contagem de folículos, utilizando microscópio Olympus CX31 empregando-se objetivas de 10X, 20X e 40X. Para as medidas de diâmetro dos folículos foram utilizadas fotomicrografias obtidas por meio do fotomicroscópio Olympus AX70, nos aumentos de 4X e de 10X, sendo que as imagens foram obtidas por meio da câmera digital Axio Cam HRc e do software Axio Vision Real 4.8. Vinte ovários fixados foram medidos, tendo o comprimento, espessuras e alturas cranial, média e caudal, aferidos por meio de paquímetro.

4.6. Análise histológica

Os cortes histológicos das lâminas, de cada espécime, foram examinados em toda a sua extensão para a realização da contagem de folículos em estádios de desenvolvimento primário e secundário, que foram subdivididos em desenvolvimento primário inicial, primário avançado, secundário inicial, secundário intermediário e secundário avançado. Foram contados os folículos atrésicos em atresia inicial, intermediária e avançada e foram contados os folículos pós-ovulatórios. Foi realizada a descrição dos folículos atrésicos, folículos pós-ovulatórios e dos folículos nos diferentes estádios de desenvolvimento. Após a captura das imagens, foram medidos diâmetros de 25 folículos em cada estágio de desenvolvimento em cada concentração de cada experimento. Os mesmos deveriam ter núcleo central e serem os mais esféricos possíveis. Para tanto, utilizou-se o programa Image-Pro Plus® Version 4.1 (Media Cybernetics, USA).

4.7. Análise estatística

Os dados (contagens de folículos e medida de diâmetro de folículos) foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias (Bartlett e Levene) e, posteriormente a análise de variância ($P < 0,05$). Quando não atendidas as pressuposições de normalidade e/ou homogeneidade, as variáveis respostas foram transformadas por meio das famílias de transformações de Box-Cox e scores de BLOM. No caso de interação significativa entre experimentos e concentrações, o efeito das concentrações para cada experimento foi determinado por análise de regressão (ajuste linear ou quadrático). Quando verificada significância dos efeitos dos experimentos de 96h e 17 dias sobre as variáveis dentro de cada concentração separadamente, foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey ($P < 0,05$). As análises foram realizadas por meio do pacote *ExpDes* do *software* livre R (Ferreira et al., 2013). A percentagem de cada folículo nos seus diferentes estádios de desenvolvimento, folículos atrésicos e folículos pós-ovulatórios foi obtida a partir do número total de folículos contados no corte histológico de cada animal. Para os dados de medidas corporais (comprimento total e padrão) e peso dos animais, foi realizado teste F.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise de água

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados referentes aos parâmetros físicoquímicos da água que foram analisados nos dois experimentos, antes de ser aplicado o diflubenzuron e após o término do período experimental.

Tabela 1. Parâmetros físicoquímicos da água no teste de toxicidade com o inseticida Dimilin® pelo período de 96h.

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

ND – Não detectado.

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

(**) CASAL (2010).

(***) SWANN (2008).

No presente estudo, o pH da água esteve dentro da faixa considerada como ideal para a espécie *H. eques*, que é de 5,0 a 7,8. (Casal, 2010), sendo que o pH recomendado para peixes tropicais deve estar entre 7 e 8. Os valores de temperatura ficaram entre os desejados para cultivo e criação de peixes tropicais, que varia entre 24,0 a 28,0°C (Cyrino et al., 2012) e para a espécie *H. eques*, cuja faixa ideal é de 22 a 26°C (Casal, 2010). Já os valores de oxigênio estiveram superiores a 6mg/L, ideais para garantir um bom desenvolvimento dos peixes (Cyrino et al., 2012) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2. Parâmetros físicoquímicos da água no teste de toxicidade com o inseticida Dimilin® pelo período de 17 dias.

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

ND – Não detectado.

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

(**) CASAL (2010).

(***) SWANN (2008).

Os teores médios de amônia não ionizada encontrados nos experimentos foram de 0 a 0,25 ± 0,001 mg/L⁻¹. Esses valores não apresentam qualquer risco de toxicidade para os peixes, pois se encontram dentro dos valores de tolerância estabelecidos para peixes tropicais. Concentrações de amônia com valores entre 0,15 e 1,0 mg/L⁻¹ podem levar à diminuição do crescimento dos peixes (Kubitza et al., 1999; Huet, 1983). Os valores de dureza total encontrados foram superiores a 20mg/L⁻¹, valores aceitáveis estão entre 20-400 mg/L⁻¹, que devem ser mantidos para um ótimo crescimento de organismos aquáticos (Swann, 2008) (Tabelas 1 e 2).

Todos os parâmetros mensurados se encontraram em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais em geral (Huet, 1983), bem como com a resolução nº 357 do CONAMA (2005). A qualidade da água foi mantida em condições adequadas para os peixes ao longo dos períodos experimentais, e os parâmetros mensurados não indicaram interferência ou sinergismo com a ação do produto testado.

5.2. Dados biométricos do *H. eques*

As tabelas 3 e 4 apresentam as médias de peso corporal, comprimento total e comprimento padrão dos peixes de cada grupo experimental, após o período de exposição ao tóxico por 96h e 17 dias, respectivamente.

Tabela 3. Valores médios de comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e peso corporal (g) dos exemplares de *H. eques* expostos ao Dimilin[®] por 96h.

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

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Não foram encontradas diferenças estatísticas pelo teste F.

Tabela 4. Valores médios de comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e peso corporal (g) dos exemplares de *H. eques* expostos ao Dimilin[®] por 17 dias.

Concentração	n	Comprimento total	Comprimento padrão	Peso corporal
Controle	10	33,23±0,48	27,90±0,39	0,54±0,24
0,01mg.L ⁻¹	10	34,21±0,70	29,01±0,59	0,57±0,19
0,1mg.L ⁻¹	10	35,57±0,26	20,64±0,22	0,63±0,14
1mg.L ⁻¹	10	37,28±0,35	30,77±0,31	0,66±0,11

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Não foram encontradas diferenças estatísticas pelo Teste F.

Os grupos experimentais foram constituídos de lotes de tamanhos homogêneos (Tabelas 3 e 4). Esse fator evita que o efeito do tóxico sobre cada animal tenha a interferência do tamanho do mesmo, pois dentro da mesma espécie, peixes menores apresentam menor resistência ao Dimilin[®] quando comparados com peixes maiores (Fisher e Hall, 1992; Nebeker et al., 1983).

5.3. O ovário do *H. eques*

Pouco se sabe sobre a biologia reprodutiva das espécies do gênero *Hyphessobrycon* no que diz respeito às fêmeas. As informações encontradas se referem à desova da espécie *Hyphessobrycon pulchripinnis* (Cole et al., 1999; Burt et al., 1988) e ao índice gonadossomático e diâmetro dos ovos de *Hyphessobrycon callistus* (Trippia, 1997).

A tabela 5 apresenta os valores médios das medidas do ovário da espécie *Hyphessobrycon eques* (Figura 3). Os ovários maduros apresentam-se como uma única estrutura, possuindo sua porção dorsocaudal côncava alojando a bexiga natatória, e sua porção cranioventral também côncava alojando os órgãos do aparelho digestório (Figura 4). O ovário *in natura* possui um aspecto frouxo, mostrando-se frágil e se desintegrando facilmente com a manipulação (Figura 5). A maioria dos peixes teleósteos possuem dois ovários, suspensos dorsalmente no celoma pelo mesovário. Entretanto, em algumas espécies há apenas um órgão, como resultado da fusão de ambos os ovários (Grier et al., 2009), como observado na espécie estudada.

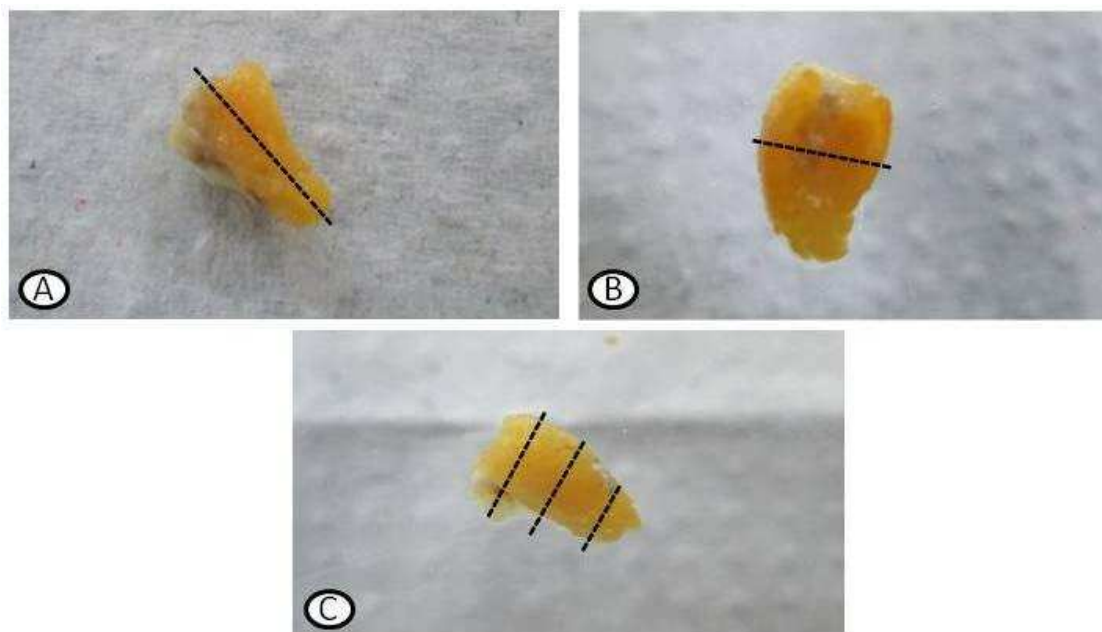


Figura 3. A - Vista lateral do ovário de *H. eques*. Linha tracejada indica comprimento. B - Vista cranial do ovário. Linha tracejada indica espessura. C - Vista lateral do ovário. Linhas tracejadas da esquerda para a direita indicam alturas cranial, média e caudal, respectivamente.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão (n=20) de dados biométricos do ovário de *H. eques* (mm).

Comprimento	Espessura cranial	Espessura terço médio	Espessura caudal	Altura cranial	Altura terço médio	Altura caudal
0.66±0.12	0.34±0.08	0.30±0.07	0.24±0.04	0.38±0.09	0.30±0.08	0.23±0.07

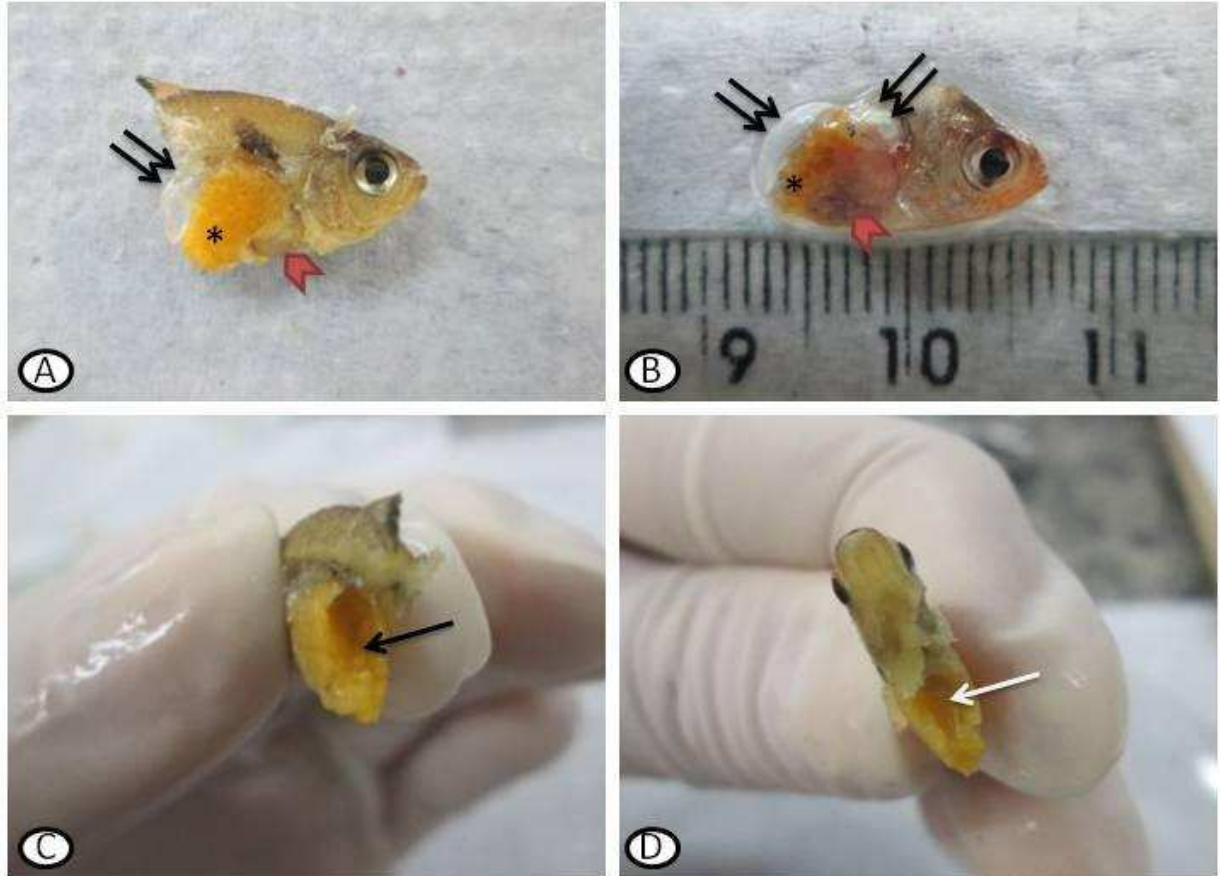


Figura 4. A e B - Ovário de *H. eques* (*). Dorsalmente, bexiga natatória (seta dupla); ventralmente ao ovário, órgãos que compõem o aparelho digestório (cabeça de seta vermelha). C - Vista caudodorsal, apresentando concavidade ocupada pela bexiga natatória (seta). D - Vista cranioventral, apresentando concavidade ocupada por órgãos do aparelho digestório (seta branca).

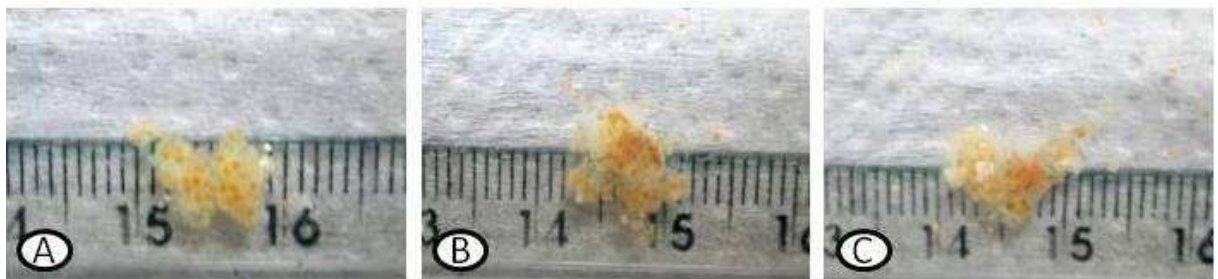


Figura 5. A, B e C - Ovários de diferentes espécimes de *H. eques*, mostrando seu aspecto frouxo.

5.4. Desenvolvimento folicular do *H. eques*

5.4.1. Desenvolvimento folicular primário e secundário

O ovário encontrou-se envolto por uma túnica albugínea de tecido conjuntivo frouxo (Figura 6A) e, em seu interior, observou-se as lamelas ovulíferas que se desprendem da albugínea e se projetam para o lume do órgão (Figura 6B). Seu epitélio apresentou-se preenchido por células germinativas, conhecido como o epitélio germinativo, onde ovogônias entram em meiose, dando origem aos ovócitos. Esta descrição é compatível com outras para peixes teleósteos (Melo et al., 2014; Wildner, 2012; Valdebenito et al., 2011; Grier et al., 2009).

As ovogônias observadas são pequenas células arredondadas, com núcleo proeminente (Figura 6C e D). Observações semelhantes também foram relatadas por Melo et al. (2014). Foram observados ovócitos primordiais, que são células maiores, com citoplasma volumoso, núcleo grande e esférico e, nucléolo evidente. Esta etapa pode ser considerada um estágio intermediário entre as ovogônias e os ovócitos em desenvolvimento primário, como observado por Grier (2002).

Durante o crescimento folicular, há dois estádios distintos: crescimento primário e crescimento secundário (Melo et al., 2014; Grier et al., 2009). O crescimento primário foi subdividido em dois estádios: desenvolvimento primário inicial e desenvolvimento primário avançado. O crescimento secundário foi subdividido em três estádios: desenvolvimento secundário inicial, desenvolvimento secundário intermediário e desenvolvimento secundário avançado (Marcon, 2013). Foram observados folículos em todos os estádios de desenvolvimento, indicando desenvolvimento assincrônico dos folículos (Murua e Saborido-Rey, 2003).

5.4.1.1. Desenvolvimento folicular primário inicial

No estágio de desenvolvimento primário inicial os ovócitos apresentaram citoplasma intensamente basófilo e núcleo esférico, central e basófilo (Figura 6D, E e F) como descrito em diversos trabalhos (Melo et al., 2014; Branco et al., 2013; Grier et al., 2009; Ravaglia e Maggese, 2003; Sarasquete et al., 2002). A basofilia do citoplasma do ovócito é resultado da acumulação de rRNA e RNA heterogêneo no citoplasma (Grier et al., 2009). O diâmetro médio dos ovócitos foi de $168,62 \pm 22,18 \mu\text{m}$ (n=50).

Neste estágio, os ovócitos exibiram apenas um único nucléolo no nucleoplasma, aumentando o seu número no decorrer do seu desenvolvimento (Figura 6E). Foi observado um único corpo de Balbiani no citoplasma, mas logo numerosos corpos puderam ser observados pela fragmentação do mesmo (Figura 6F) (Quagio-Grassiotto et al., 2011; Grier et al., 2009).

Os corpos de Balbiani são estruturas temporárias, observadas durante o crescimento primário inicial na região perinuclear do citoplasma. São associados a mitocôndrias e ricos em ácidos nucleicos (Chini et al., 2001). Sua função é incerta, mas sua dispersão no citoplasma pode ajudar a explicar a perda da intensidade da basofilia no desenvolvimento primário avançado. O termo “núcleo vitelínico” tem sido usado para descrever corpos de Balbiani, mas esse termo não é correto, pois os corpos de Balbiani não possuem vitelo (Grier et al., 2009).

5.4.1.2. Desenvolvimento folicular primário avançado

No estágio de desenvolvimento primário avançado foi observado um aumento no volume do citoplasma e, conseqüentemente, um aumento no diâmetro do folículo ($331,91 \pm 37,01 \mu\text{m}$; $n=50$) e diminuição da relação núcleo/citoplasma, tal como descrito por Marques et al. (2000). O núcleo passou a ter contorno irregular, cuja membrana nuclear emitia projeções para o nucleoplasma, onde foi possível observar vários nucléolos. O citoplasma se apresenta com uma granulação grosseira, diminuindo a basofilia do mesmo (Figura 6E e F e 7A). Neste estágio foi possível observar células foliculares cúbicas e zona radiata delgada (Figura 7A) (Marques et al., 2000).

5.4.1.3. Desenvolvimento folicular secundário inicial

No estágio de desenvolvimento secundário inicial, o volume do citoplasma do ovócito aumentou em relação ao estágio anterior, aumentando conseqüentemente seu diâmetro ($460,53 \pm 58,27 \mu\text{m}$; $n=50$). O núcleo continuou a ter contorno irregular, mas apresentou um nucleoplasma acidófilo. O citoplasma continuou granular, fracamente basófilo e foi possível observar o surgimento das vesículas corticais, que compõem os alvéolos corticais (Figura 7B).

Os alvéolos corticais foram encontrados na periferia do ovócito, como também observado por Grier et al. (2009). De acordo com Patiño e Sullivan (2002), o seu conteúdo apresenta grande quantidade de glicoproteínas (polisialoglicoproteína) sintetizadas dentro do próprio ovócito que são incorporadas aos alvéolos recém-formados. Como proposto por Grier et al. (2009), sua função está ligada a prevenção da poliespermia após a ovulação e a proteção do embrião de agressões físicas, pelo endurecimento da zona radiata.

A zona radiata continuou a se desenvolver. No polo animal do ovócito, uma estrutura especial pôde ser observada, a micrópila (Figura 7B e C). A micrópila é uma invaginação da zona radiata, formando um canal em forma de cone que é ocupado por uma célula folicular modificada em forma de pirâmide. O diâmetro da abertura da micrópila difere entre as espécies. Ela é o local onde o espermatozoide entra no ovócito durante a fecundação. O diâmetro da abertura coincide com o tamanho do espermatozoide, sendo suficiente para permitir a entrada de apenas um espermatozoide (Grier et al., 2009).

5.4.1.4. Desenvolvimento folicular secundário intermediário

No estágio de desenvolvimento secundário intermediário foi observado aumento no diâmetro do folículo ($664,58 \pm 81,37 \mu\text{m}$; $n=50$), células foliculares pavimentosas, zona radiata bem desenvolvida, apresentando contorno irregular e pregueada em algumas regiões e, núcleo mais acidófilo. Neste estágio ocorreu o começo da deposição de vitelo na periferia do ovócito (Figura 7C, D e E), como observado por Grier et al. (2009) e Sarasquete et al. (2002).

O local de surgimento dos glóbulos de vitelo pode ser diferente dependendo da espécie, podendo se iniciar também ao redor do núcleo (Brown-Peterson et al., 2011; Grier et al., 2009). Por outro lado, também tem sido relatado que a deposição do vitelo pode ocorrer simultaneamente com a deposição das vesículas corticais, ou mais cedo, em algumas espécies (Grier et al., 2009). Os glóbulos de vitelo observados neste estágio eram acidófilos, tipicamente pequenos, presentes na periferia do ovócito e se misturavam com os alvéolos corticais (Grier et al., 2009).

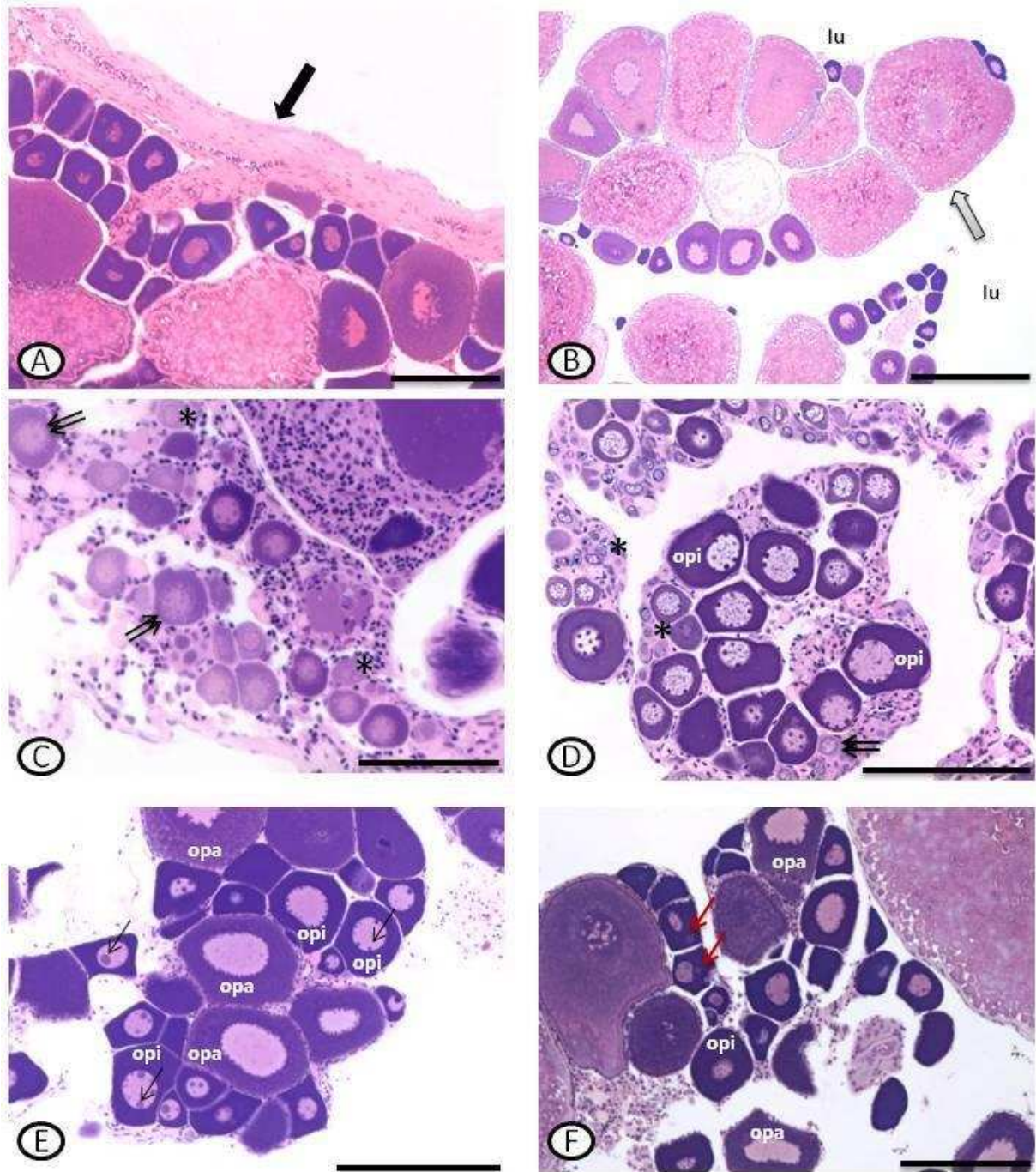


Figura 6. A - Ovário envolto externamente por serosa peritoneal (seta preta). B - Lamela ovulífera onde sem encontram ovogônias e folículos em diferentes estádios de desenvolvimento (seta cinza com contorno preto), lume (lu). C e D - Ovogônias (asterisco), ovócitos primordiais (seta dupla) e folículos em desenvolvimento primário inicial (opi). E e F - Folículos em desenvolvimento primário inicial (opi) e primário avançado (opa), nucléolos no nucleoplasma (seta) e corpo de Balbiani (seta vermelha). **Coloração:** Hematoxilina-eosina. **Barra:** A (500µm); B, E e F (200µm); C (50µm); D (150µm).

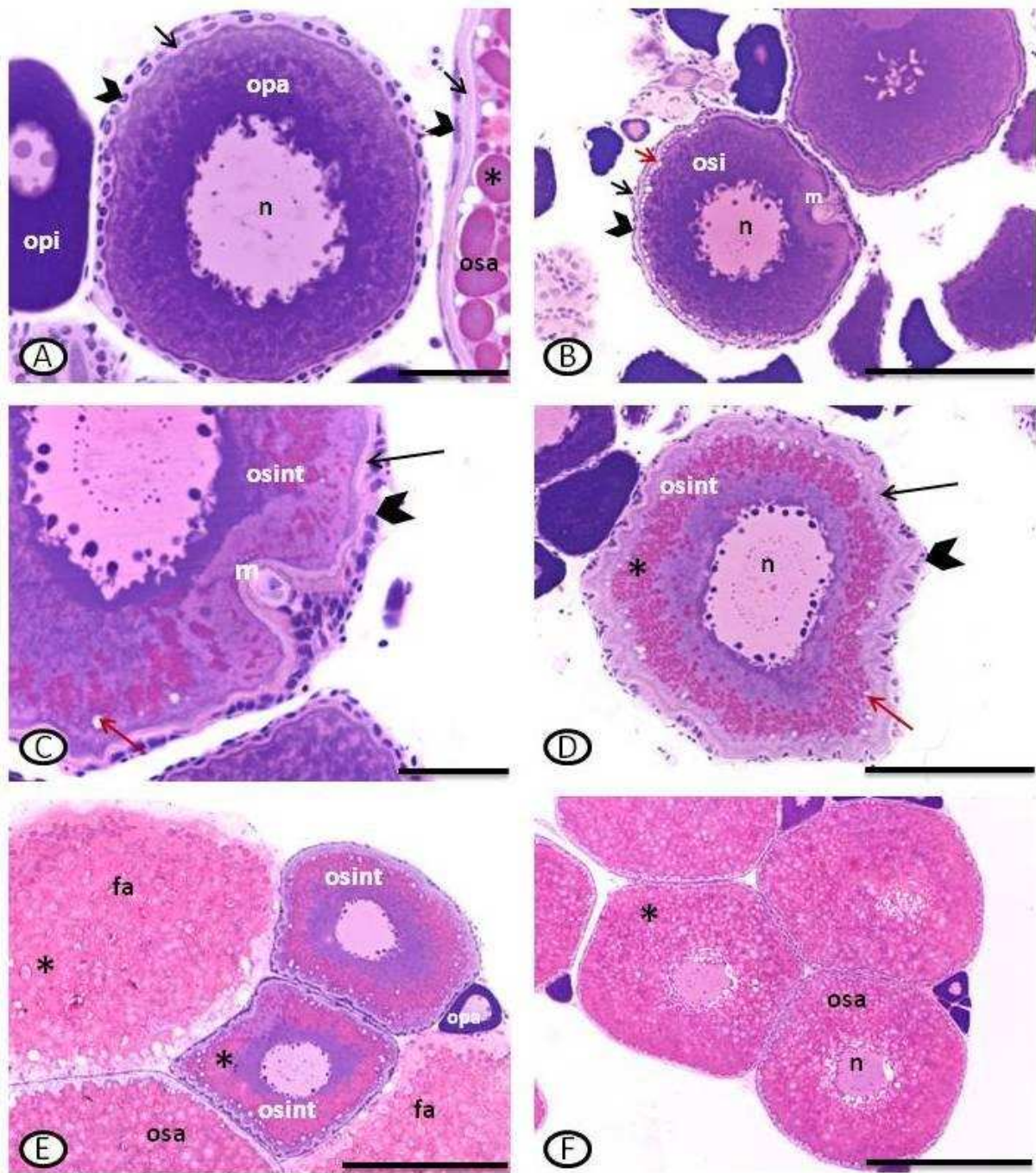


Figura 7. A - Folículo em desenvolvimento primário inicial (opi); folículo em desenvolvimento primário avançado (opa) envolto pela zona radiata (seta) e por células foliculares cúbicas (cabeça de seta), apresentando núcleo (n) basófilo com contorno irregular e folículo em desenvolvimento secundário avançado (osa) envolto pela zona radiata (seta) e por células foliculares pavimentosas (cabeça de seta). B - Folículo em desenvolvimento secundário inicial (osi), apresentando vesículas corticais (seta vermelha), micrópila (m), núcleo acidófilo (n) e envolto pela zona radiata (seta) e por células foliculares pavimentosas (cabeça de seta). C e D - Folículo em desenvolvimento secundário intermediário (osint), apresentando vesículas corticais (seta vermelha), micrópila (m) e pequenos glóbulos de vitelo (asterisco). E e F- Folículo em desenvolvimento secundário intermediário (osint); folículo em desenvolvimento secundário avançado (osa), apresentando grandes glóbulos de vitelo (asterisco) e núcleo (n) fortemente acidófilo; nota-se também a presença de folículos atrécicos (fa). **Coloração:** Hematoxilina-eosina. **Barra:** A e C (50µm); B e D (150µm); E (300µm); F (500µm).

A vitelogênese se refere à captação de vitelogenina pelo ovócito e ao seu armazenamento em forma de glóbulos (Grier et al., 2009). A vitelogenina é uma grande fosfoglicolipoproteína sintetizada pelo fígado, transportada por meio da corrente sanguínea para os ovários, e incorporada aos ovócitos em desenvolvimento secundário (Brown-Peterson et al., 2011; Grier et al., 2009; Patiño e Sullivan, 2002). Ela passa dos vasos sanguíneos para os capilares da teca e segue para as células foliculares, atingindo a superfície do ovócito através de canais da zona radiata, sendo incorporada ao citoplasma por receptor específico (Melo et al., 2014; Patiño e Sullivan, 2002).

O vitelo é definido como o “material nutritivo de armazenamento do ovócito”. Após a fecundação, torna-se a fonte de materiais de construção e de energia para o desenvolvimento do embrião (Grier et al., 2009). A vitelogenina origina as duas principais proteínas do vitelo, lipovitelina e fosvitina. Lipovitelina é uma importante fonte de aminoácidos e lipídios que suportam o desenvolvimento embrionário. Fosvitina fornece os minerais necessários para o desenvolvimento dos embriões e para o desenvolvimento do esqueleto e funções metabólicas (Patiño e Sullivan, 2002).

Neste estudo, o vitelo foi observado como um fluido armazenado em glóbulos, entretanto, em algumas espécies de teleósteos o vitelo é armazenado em uma forma cristalina, relativamente insolúvel (Grier et al., 2009).

5.4.1.5. Desenvolvimento folicular secundário avançado

No estágio de desenvolvimento secundário avançado, o citoplasma mostrou-se fortemente acidófilo (Figura 7E e F) (Sarasquete et al., 2002), a zona radiata apresentou-se mais espessa e as células foliculares eram pavimentosas (Figura 7A). Os glóbulos de vitelo aumentaram em quantidade e em tamanho e o diâmetro do folículo aumentou significativamente ($1236,30 \pm 88,69 \mu\text{m}$; $n=50$). Estas mesmas características foram observadas por Grier et al. (2009) e Ravaglia e Maggese (2003). Neste estágio de desenvolvimento, os alvéolos corticais são deslocados para uma camada relativamente fina na periferia do citoplasma pelos glóbulos de vitelo (Grier et al., 2009).

No final do desenvolvimento folicular, o núcleo migra para o polo animal (Sarasquete et al., 2002). Quando isso acontece, ocorre a desintegração do seu envoltório, que é necessária para a divisão celular meiótica. Estas alterações nucleares são comuns a todos os teleósteos e todos os vertebrados. Após a ovulação, o ovócito interrompe a meiose até a fertilização, momento em que a segunda divisão meiótica é completada com a expulsão do segundo corpo polar e os pró-núcleos haploides se juntam para formar um zigoto diploide. Durante a ovulação, o ovócito deixa no ovário o folículo pós-ovulatório, estrutura remanescente deste processo (Grier et al., 2009).

5.4.2. Folículos pós-ovulatórios

Após a expulsão do ovócito, as estruturas restantes do folículo (células foliculares, membrana basal e teca), formam o folículo pós-ovulatório, que foram caracterizados por possuírem lume amplo e irregular, e parede única constituída por células foliculares hipertrofiadas, membrana basal delgada e teca de natureza conjuntiva, à semelhança do que foi descrito por Melo et al. (2014), Grier et al. (2009), Sarasquete et al. (2002), Marques et al. (2000) (Figura 8A e B).

Como os folículos pós-ovulatórios são uma fonte de hormônios esteroides, incluindo o estrógeno, a possibilidade levantada foi de que eles estão envolvidos na indução do ciclo de desenvolvimento folicular seguinte (Grier et al., 2009). Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), folículos pós-ovulatórios podem persistir por pelo menos duas semanas (Grier et al., 2007). Já em outras espécies, permanecem por alguns dias ou, até mesmo, horas (Grier et al., 2009), como observado por Marcon (2008), em *Astyanax bimaculatus*.

A presença de folículos pós-ovulatórios pode ser usada para estimar a frequência de desova, parâmetro importante na biologia reprodutiva de peixes. O mecanismo de reabsorção dos folículos pós-ovulatórios está relacionado ao fato de que quando as células foliculares entram em apoptose, elas são fagocitadas pelas células foliculares normais ou por células macrofágicas próximas ao lume (Drummond et al., 2000).

5.4.3. Folículos atrésicos

A atresia folicular pode ser caracterizada utilizando um número variável de estádios de desenvolvimento. Neste trabalho foram divididos em três estádios: atresia inicial, atresia intermediária e atresia avançada.

Na atresia inicial foi possível observar descontinuidade da zona radiata e hipertrofia das células foliculares (Figura 8C e D), também observadas por outros autores (Santos et al., 2008; Sarasquete et al., 2002; Miranda et al., 1999). Entratanto, Melo et al. (2014) observaram que alguns folículos atrésicos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresentaram uma zona radiata aparentemente intacta. As células foliculares se tornaram vacuolizadas e continham um material granular de aspecto similar aos glóbulos de vitelo (Figura 8D). Já Marcon (2013), em um estudo utilizando o lambari (*Astyanax bimaculatus*) submetido ao inseticida Thiodan[®], obervou essa característica no estágio de atresia caracterizado como intermediária.

Na atresia intermediária foi observado início da fusão e liquefação dos glóbulos de vitelo, desintegração e fragmentação da zona radiata e, invasão do citoplasma pelas células foliculares. O folículo vai diminuindo aos poucos e perdendo o seu formato (Figura 8E e F) (Marcon, 2013; Santos et al., 2008; Sarasquete et al., 2002; Miranda et al., 1999). As células foliculares desempenham um papel muito ativo durante a atresia na digestão e remoção do ovócito (Grier et al., 2009; Miranda et al., 1999).

Folículos em atresia avançada não foram observados. Neste estágio, as células foliculares engolfam os resíduos finais do ovócito e ocorre o aparecimento de grânulos castanho-amarelados (Miranda et al., 1999).

Folículos podem se tornar atrésicos em qualquer estágio da ovogênese, mas, como foi observado neste trabalho, é mais frequente em folículos que se encontram em desenvolvimento secundário (Branco et al., 2013; Marcon, 2013; Grier et al., 2009; Wood e Van Der Kraak, 2001).

O desenvolvimento do folículo atrésico envolve a degeneração e a reabsorção do ovócito, proliferação e hipertrofia das células foliculares, que fagocitam o ovócito degenerado e, fagocitose de células foliculares após a reabsorção do ovócito (Grier et al., 2009; Santos et al., 2008; Sarasquete et al., 2002; Wood e Van Der Kraak, 2001).

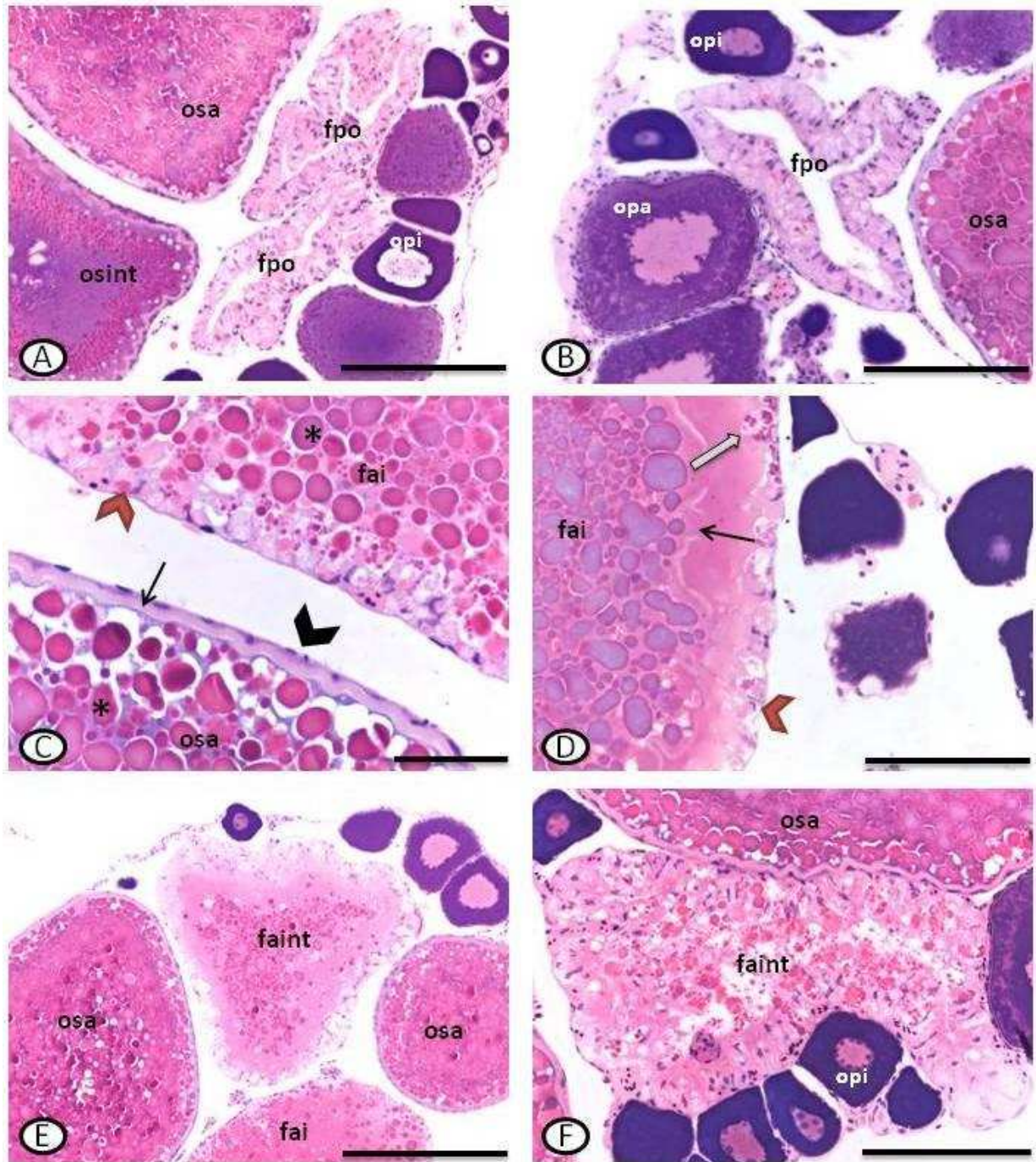


Figura 8. A e B - Folículo pós-ovulatório (fpo). C - Folículo em desenvolvimento secundário avançado (osa), envolto por zona radiata intacta (seta) e células foliculares pavimentosas (cabeça de seta preta); folículo ovariano em atresia inicial (fai), apresentando células foliculares hipertrofiadas (cabeça de seta vermelha); glóbulos de vitelo (asterisco). D - Folículo em atresia inicial (fai), apresentando células foliculares hipertrofiadas (cabeça de seta vermelha) com material granular (seta cinza) e zona radiata fragmentada (seta). E e F - Folículo em atresia intermediária, apresentando liquefação dos glóbulos de vitelo. **Coloração:** Hematoxilina-eosina. **Barra:** A e B (200 μ m); C (50 μ m); D (100 μ m); E (300 μ m) e F (150 μ m).

5.5. Efeitos do diflubenzuron no desenvolvimento dos folículos ovarianos

No presente estudo não foi observada nenhuma alteração morfológica nos folículos de *H. eques* que pudesse ser atribuída à ação do diflubenzuron nas concentrações usadas, como já foi observado em outros estudos com outros tóxicos e em outras espécies. Por exemplo, Dutta e Dalal (2008) observaram nos folículos de *Lepomis macrochirus* expostos ao endosulfan, retração nuclear e citoplasmática e, nos folículos em maturação avançada, aspecto vazio, sem citoplasma, além de deformações e necrose de núcleo. Entretanto, Marcon (2013), em um estudo utilizando fêmeas de *Astyanax bimaculatus* expostas ao inseticida Thiodan[®], também não observou as alterações morfológicas mencionadas acima.

Goulart (2012), em um estudo usando machos da mesma espécie utilizada neste estudo (*H. eques*), expostos ao diflubenzuron, também nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1mg.L⁻¹ e pelos mesmos períodos de tempo, observou nos testículos picnose nuclear e desorganização tecidual. Entretanto, nos ovários das fêmeas de *H. eques* não foi observada nenhuma alteração morfológica. Ballesteros et al. (2007) utilizando peixes machos e fêmeas da espécie *Jenynsia multidentata* expostos ao endosulfan, verificaram que as fêmeas foram mais resistentes ao tóxico do que os machos que, neste caso, foram mais sensíveis. Acredita-se que essa resistência foi devido ao maior teor de lipídeos encontrado nas fêmeas. Esse fator pode explicar a maior resistência das fêmeas de *H. eques* às concentrações de diflubenzuron utilizadas quando comparadas com as repostas observadas nos machos desta mesma espécie.

5.5.1. Diâmetro dos folículos

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) no diâmetro médio dos folículos em desenvolvimento primário inicial (Pi) entre os experimentos de 96h e de 17 dias nos grupos controle, sendo o diâmetro médio maior no experimento de 17 dias (Tabela 7- valores em negrito com letras maiúsculas). Houve, também, diferença significativa ($P < 0,05$) no diâmetro médio dos folículos em desenvolvimento secundário intermediário (Sint) entre os experimentos dentro dos grupos controle e da concentração 1mg.L⁻¹, sendo o diâmetro médio dos folículos maior no experimento de 96h do grupo controle (Tabela 7- valores em negrito com letras maiúsculas).

Entretanto, nas concentrações de 1mg.L^{-1} , o diâmetro médio dos folículos foi maior no experimento de 17 dias (Tabela 7- valores em negrito com letras maiúsculas).

Ao comparar o diâmetro médio dos folículos em cada concentração dentro de cada experimento, observou-se que houve diferença significativa ($P<0,05$) entre as médias do diâmetro dos folículos em desenvolvimento primário inicial (Pi) no experimento de 96h, com diâmetro maior na concentração $0,1\text{mg.L}^{-1}$ (Tabela 7- valor em negrito com asterisco), sendo que o ajuste da regressão foi linear. Houve também diferença significativa ($P<0,05$) entre as médias de diâmetro dos folículos em desenvolvimento secundário intermediário (Sint) dentro do experimento de 96h, sendo que o ajuste da regressão foi linear, indicando um decréscimo no logaritmo diâmetro médio dos folículos, à medida que aumentou a concentração (Tabela 7- valores com letras minúsculas).

Também houve diferença significativa ($P<0,05$) entre as médias dos diâmetros dos folículos em desenvolvimento secundário inicial (Si) no experimento de 17 dias, com ajuste de regressão linear, ocorrendo aumento no diâmetro médio dos folículos na concentração $0,1\text{mg.L}^{-1}$ (Tabela 7- valor em negrito com asterisco).

De acordo com os resultados apresentados para diâmetro dos folículos, pode-se inferir que, apesar de ter havido resultados significativos, como houve variações significativas entre os grupos controle, podemos dizer que as variações encontradas nas outras situações podem não estar relacionadas ao agente tóxico usado.

Diferentes substâncias tóxicas, por diferentes vias, em diferentes espécies de peixes e em diferentes ambientes podem afetar de formas distintas a reprodução desses animais. Honji et al. (2009) relataram baixa fecundidade e aumento do diâmetro dos ovócitos nos peixes *Salminus hilari* mantidos em cativeiro quando comparados com peixes de ambientes naturais. Forsgren et al. (2013) observaram um número menor de folículos, mas folículos com diâmetros maiores em *Oncorhynchus mykiss* expostos ao inseticida piretroide bifentrina, e Marcon (2013) também verificou aumento no diâmetro dos folículos vitelogênicos de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* expostas ao Thiodan® no experimento com adaptação/com alimentação, sugerindo mecanismo adaptativo com maiores diâmetros de folículos no meio impactado. Por outro lado, Mishra e Mohanty (2010) relataram uma redução do diâmetro dos folículos de *Channa punctatus* expostos ao cromo hexavalente.

Talvez pelas concentrações de diflubenzuron usadas e duração dos experimentos, não foram observados seus efeitos subletais. Como o produto não foi desenvolvido para uso veterinário e não existe um protocolo de uso para este fim, os piscicultores podem estar usando quantidades muito maiores, já que o produto não causa um aparente desconforto nos peixes, podendo, no entanto, causar sérios danos aos animais.

Luzivotto-Santos et al. (2007), observaram que o diflubenzuron foi o composto mais usado pelos piscicultores na bacia do rio Mogi Guaçu para combater ectoparasitas, 23 empreendimentos, dos 30 visitados. Entretanto, apesar de ter sido identificado o seu uso em 23 empreendimentos, em apenas 9 deles foi possível precisar as concentrações empregadas. De acordo com Luzivotto-Santos et al. (2007), houve um empreendimento que admitiu ter utilizado uma concentração em torno de 70 a 80 g.m⁻³, valores muito próximos das concentrações letais para diversas espécies de peixes (PAN, 2007).

5.5.2. Quantificação dos folículos

Analisando o número médio dos folículos de cada animal nos experimentos de 96h e de 17 dias dentro de cada concentração separadamente, foi observado que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias de folículos em desenvolvimento primário avançado (Pa), sendo o número médio de folículos maior na concentração de 0,1mg.L⁻¹ do experimento de 96h (Tabela 8- valores em negrito com letras maiúsculas). Houve diferença significativa ($P < 0,05$) também nas médias de folículos em desenvolvimento primário avançado (Pa), sendo o número médio de folículos maior na concentração 1mg.L⁻¹ do experimento de 17 dias (Tabela 8- valores em negrito com letras maiúsculas).

Ao comparar o número médio de folículos em cada concentração dentro de cada experimento separadamente, observou-se que dentro do experimento de 96h não houve diferença significativa, mas no experimento de 17 dias o número médio de folículos em desenvolvimento primário avançado (Pa) foi maior na maior concentração (1mg.L⁻¹), sendo que o ajuste da regressão foi linear (Tabela 8- valor em negrito com asterisco).

Apesar dos resultados significativos para a variável folículo em desenvolvimento primário avançado (Pa), pelo fato de se apresentarem sem uma certa coerência, pode-se dizer que essas variações encontradas podem não ter sido causadas pelo produto utilizado, pois foi constatado que as concentrações não exerceram influência significativa sobre as variáveis e essa diferença ocorre também na concentração $0,1\text{mg.L}^{-1}$ no experimento de 96h e, na concentração de 1mg.L^{-1} no experimento de 17 dias, para a mesma variável.

Alguns trabalhos têm demonstrado a interferência de agentes tóxicos na quantidade de folículos nos seus diferentes estádios de desenvolvimento em peixes. Essa interferência pode variar dependendo da espécie, do agente tóxico e das concentrações. Por exemplo, Dutta e Dalal (2008) observaram uma menor quantidade de folículos em desenvolvimento secundário avançado comparando com os folículos em desenvolvimento primário de *Lepomis macrochirus* expostos ao endossulfan e Marcon (2013), em um estudo utilizando fêmeas de *Astyanax bimaculatus* expostas ao inseticida Thiodan[®], observou que os experimentos com aclimatação apresentaram uma maior quantidade de folículos primários e secundários quando comparadas com os peixes sem aclimatação. Chakrabarty et al. (2012) relataram um aumento na quantidade de folículos pré-vitelogênicos de *Clarias batrachus* expostos ao endossulfan e a flutamida (separadamente), mostrando que houve uma aceleração do crescimento dos folículos. Entretanto, não foi observada interferência significativa na quantidade de folículos do *H. eques* nas concentrações utilizadas do diflubenzuron.

Tabela 7. Diâmetro médio (em μm) dos folículos de *H. eques* expostos ao diflubenzuron por 96h e 17 dias em diferentes concentrações.

	96h					17 dias				
	Pi	Pa	Si	Sint	Sav	Pi	Pa	Si	Sint	Sav
Controle	159,27±25,47^B	335,62±32,65	447,18±57,95	701,15±79,79^{Aa}	1220,10±85,92	177,98±13,93^A	328,20±41,93	473,87±57,83	628,02±68,14^B	1252,49±91,97
0,01mg.L⁻¹	157,78±21,64	330,34±42,11	458,98±49,20	667,15±68,99 ^b	1194,90±95,92	165,92±22,36	338,52±44,59	456,67±41,47	635,17±71,59	1214,19±113,16
0,1mg.L⁻¹	167,16±23,03*	321,12±41,15	467,56±47,79	647,62±86,45 ^c	1203,24±84,12	159,88±24,46	310,14±49,51	480,48±53,67*	648,97±69,82	1215,49±84,25
1mg.L⁻¹	148,35±22,04	332,36±23,26	440,23±54,96	601,36±97,60^{Bd}	1195,47±75,33	161,93±34,72	328,04±44,83	444,08±64,55	647,04±83,79^A	1196,91±68,18

Pi: folículo em desenvolvimento primário inicial; Pa: folículo em desenvolvimento primário avançado; Si: folículo em desenvolvimento secundário inicial; Sint: folículo em desenvolvimento secundário intermediário; Sav: folículo em desenvolvimento secundário avançado. Valores destacados indicam diferença estatística significativa ($P<0,05$) pela análise de variância (teste F). Valores em negrito com letras maiúsculas indicam diferença estatística ($P<0,05$) entre os experimentos (96h e 17 dias) pelo teste Tukey. Valores em negrito com asterisco indicam diferença estatística ($P<0,05$), mostrando o efeito das concentrações em cada experimento separadamente, pela análise de regressão (ajuste linear). Valores com letras minúsculas indicam diferença estatística ($P<0,05$), mostrando decréscimo no logaritmo diâmetro médio dos folículos, à medida que aumenta a concentração, pela análise de regressão (ajuste linear).

Tabela 8. Número médio de folículos de *H. eques* expostos ao diflubenzuron por 96h e 17 dias em diferentes concentrações.

	96h					17 dias				
	Pi	Pa	Si	Sint	Sav	Pi	Pa	Si	Sint	Sav
Controle	111±58,97	16,8±5,79	8,2±2,97	7,4±2,59	21,3±10,79	107,1±32,84	16,7±9,10	12,6±3,57	6,5±1,58	25,5±7,85
0,01mg.L⁻¹	111,3±69,87	14,1±6,33	7,1±1,85	6,1±1,91	16,9±10,82	113,3±55,18	16,8±8,31	9,4±4,17	5,4±0,97	20,3±10,65
0,1mg.L⁻¹	118,4±76,33	24,9±14,05^A	6,5±2,55	5,7±1,06	16,7±7,97	90,6±40,85	14,6±9,65^B	11,5±8,46	8,7±5,38	18,1±6,85
1mg.L⁻¹	85,3±56,31	19,7±15,76^B	7,2±1,99	5,6±0,70	12,3±5,83	102,4±45,17	27,3±5,60^{A*}	9,6±2,55	9,2±3,71	19,9±7,62

Pi: folículo em desenvolvimento primários inicial; Pa: folículo em desenvolvimento primário avançado; Si: folículo em desenvolvimento secundário inicial; Sint: folículo em desenvolvimento secundário intermediário; Sav: folículo em desenvolvimento secundário avançado. Valores destacados indicam diferença estatística significativa ($P<0,05$) pela análise de variância (teste F). Valores em negrito com letras maiúsculas indicam diferença estatística ($P<0,05$) entre os experimentos (96h e 17 dias) pelo teste Tukey. Valores em negrito com asterisco indicam diferença estatística ($P<0,05$), mostrando o efeito das concentrações em cada experimento separadamente, pela análise de regressão (ajuste linear).

5.5.3. Percentual dos diferentes estádios de desenvolvimento folicular

De acordo com a figura 9, os folículos em quantidade maior são os que estavam em desenvolvimento primário inicial (Pi). Folículos em desenvolvimento primário avançado (Pa) e secundário avançado (Sav) apresentaram valores muito próximos. Os folículos em desenvolvimento secundário inicial (Si) e secundário intermediário (Sint) também apresentaram valores muito próximos, representando também os menores valores.

Na figura 10, podemos observar que as percentagens de folículos pós-ovulatórios não variaram muito entre os experimentos e as concentrações. A figura 10 também mostra a percentagem de folículos atrésicos iniciais e intermediários nos experimentos de 96h e de 17 dias. Observa-se que enquanto a percentagem de folículos em atresia inicial é maior no controle do experimento de 96h, no experimento de 17 dias a percentagem maior ocorre na concentração de 1 mg.L⁻¹. Com relação à atresia intermediária, no experimento de 17 dias não houve grandes diferenças entre as concentrações. Por outro lado, no experimento de 96h ocorreu um aumento na concentração 1mg.L⁻¹.

Os folículos pós-ovulatórios são uma fonte de hormônios esteroides (Grier et al., 2009) e podem permanecer por semanas em determinadas espécies (Grier et al., 2007). Sua presença pode ser usada para estimar a frequência de desova, um parâmetro importante na biologia reprodutiva de peixes.

O aumento da atresia pode indicar uma patologia (Grier et al., 2009; Santos et al., 2008) causada muitas vezes por contaminação ambiental, que intensifica a incidência de folículos atrésicos (Grier et al., 2009; Santos et al., 2008; Miranda et al., 1999). Mishra e Mohanty (2010) e Xiao et al. (2007) observaram esses resultados e Marcon (2013) observou uma maior frequência de atresia folicular em fêmeas de *Astyanax bimaculatus* expostas ao Thiodan[®] no experimento em que houve aclimatação prévia. Com o aumento da atresia ocorre uma diminuição da capacidade reprodutiva dos animais e, com isso, a atresia folicular também tem sido utilizada como um biomarcador histopatológico para avaliar impacto ambiental (Santos et al., 2008).

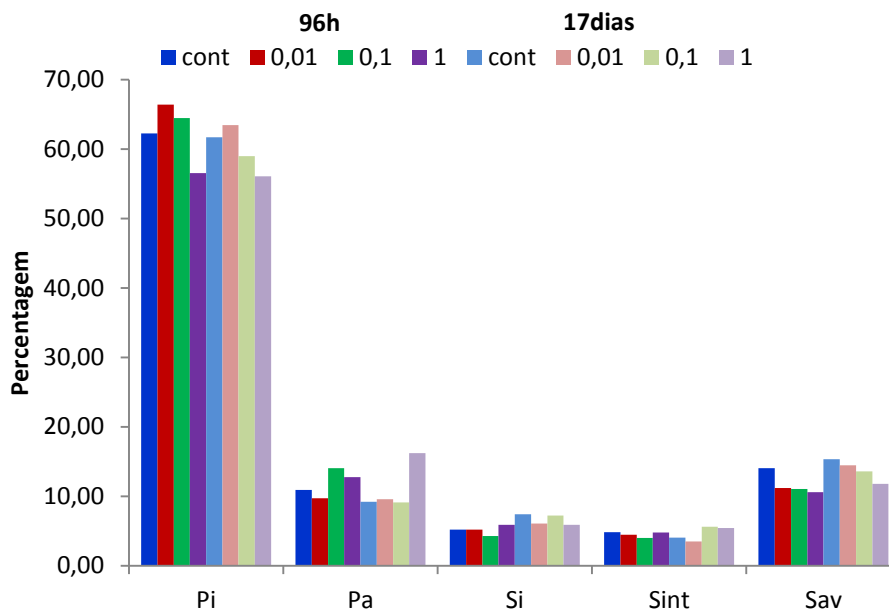


Figura 9. Percentagem de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento de *H. eques* expostos ao diflufenuron por 96h e 17 dias em diferentes concentrações (controle; 0,01; 0,1; e 1 mg.L⁻¹).
 Pi: folículo em desenvolvimento primários inicial; Pa: folículo em desenvolvimento primário avançado; Si: folículo em desenvolvimento secundário inicial; Sint: folículo em desenvolvimento secundário intermediário; Sav: folículo em desenvolvimento secundário avançado.

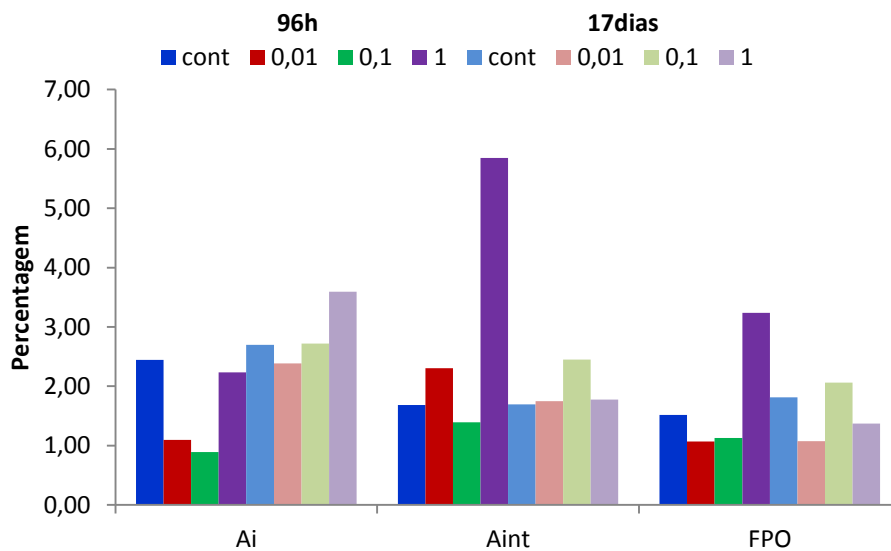


Figura 10. Percentagem de folículos em atresia inicial (Ai) e atresia intermediária (Aint) e de folículos pós-ovulatórios (FPO) de *H. eques* expostos ao diflufenuron por 96h e por 17 dias em diferentes concentrações (controle; 0,01; 0,1; e 1 mg.L⁻¹).

6. CONCLUSÕES

O ovário maduro do *Hyphessobrycon eques* apresenta-se como uma única estrutura, possuindo sua porção caudodorsal e cranioventral côncavas, dando abrigo à bexiga natatória e aos órgãos do aparelho digestório, respectivamente.

O desenvolvimento dos folículos é assincrônico, envolve estádios com características gerais comuns aos demais teleósteos e os folículos em desenvolvimento primário inicial foram registrados em maior quantidade que os demais estádios.

No presente estudo não foi observada nenhuma alteração morfológica nos folículos e nem nos ovários de *H. eques* após exposição ao diflubenzuron nas concentrações estabelecidas (0,01; 0,1 e 1mg.L⁻¹) por 96h e 17 dias.

Após 96h de exposição, ocorreu aumento da atresia intermediária na concentração 1mg.L⁻¹.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diflubenzuron não foi desenvolvido para uso veterinário e não existe um protocolo de uso para este fim. Como não existe um protocolo, os piscicultores podem estar usando as mais variadas concentrações por períodos de tempo também variados. Devido ao fato do diflubenzuron não causar um aparente desconforto para os peixes quando colocado na água, os piscicultores podem estar usando concentrações muito maiores que aquelas usadas neste trabalho, podendo induzir a ocorrência de sérios danos aos peixes e aos seus consumidores, devido à toxicidade de seus metabólitos. Ademais, mais estudos devem ser realizados utilizando outros órgãos, espécies e concentrações para melhor estabelecer concentrações que podem acarretar danos à saúde dos peixes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2. ed. ABNT: versão corrigida 31/03/2006. p.19. 2006 - Parte 1 - Sistema estático - Método de ensaio. Rio de Janeiro, NBR 15088, 2004.
- ADAMS, M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem stress**. Maryland: American Fisheries Society Bethesda, USA, 2002.
- ALTIERI, A., **Argulose ou piolhos d' água**, 2006. Disponível em <<http://aquariofilia.multiply.com/journal>> Acessado em 10 jan 2012.
- American Public Health A, Eaton AD, American Water Works A, Water Environment F. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C.: APHA-AWWAWEF.
- ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M. BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, p.61-72, 2007.
- BALLESTEROS, M.L.; BIANCHI, G.E.; CARRANZA, M.; BISTONI, M.A. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Journal of Environmental Science and Health**, v.42, n.4. p.351-357, 2007.
- BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular levels. **Environmental Health Perspectives**, v.105, p.21-35 1997.
- BRANCO, I.S.L.; VIANA, D.L.; FÉLIX, R.T.S.; VÉRAS, D.P.; HAZIN, F.H.V. Oocyte development and ovarian maturation of the black triggerfish, *Melichthys niger* (Actinopterygii: Balistidae) in São Pedro e São Paulo Archipelago, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.11, n.3, p.597-606, 2013.
- BROWN-PETERSON, J.N.; WYANSKI, D.M.; SABORIDO-REY, F.; MACEWICZ, B.J.; LOWERRE-BARBIERI, S.K. A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. **Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science**, v.3, p.52-70, 2011.
- BURT, A.; KRAMER, D.L.; NAKATSURU, K.; SPRY, C. The tempo of reproduction in *Hyphessobrycon pulchripinnis* (Characidae), with a discussion on the biology of “multiple spawning” in fishes. **Environmental Biology of Fishes**, v.22, p.15-27, 1988.
- BURTLE G., MORRISON J. Dimilin for control of lernaea in golden shiner ponds. **Arkansas Academy of Science**, v.41, p.17-19, 1987.
- CARVALHO, L.N.; DEL CLARO, K. Effects of predation pressure on the feeding behavior of the tetra serpa *Hyphessobrycon eques* (Ostariophysi, Characidae) **Acta Ethologica**, v.7, p.89-93, 2004.
- CASAL, C.M.V. FishBase. **World Wide Web Electronic Publication**. 2010. Disponível em: <<http://www.fishbase.org>> Acessado em 29 nov 2012.
- CASTRO, A.A.; LACERDA, M.C.; ZANUNCIO, T.V.; RAMALHO, F.S.; POLANCZYK, R.A.; SERRÃO, J.E.; ZANUNCIO, J.C. Effect of the insect growth regulator diflubenzuron on the predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Ecotoxicology**, v.21, p.96-103, 2012.
- CHAKRABARTY, S.; RAJAKUMAR, A.; RAGHUVeer, K.; SRIDEVI, P.; MOHANACHARY, A.; PRATHIBHA, Y.; BASHYAM, L.; DUTTA-GUPTA, A; SENTHILKUMARAN, B. Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.155, p.491-497, 2012.

CHASIN, A.A.M.; PEDROZA, M.F.M. O estudo da toxicologia. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: RIMA/INTERTOX, 2003. p.1-25.

CHINI, H.A.S.; GARCIA, J.A.D.; MAISTRO, L.E.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Leporinus striatus* Kner (Teleostei, Characiformes, Anostomidae) from the Rio Sapucaf, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.18, n.4, p.1065-1072, 2001.

CLOYD, R. **Chemical classes and their modes of activity**. College of Agricultural, Consumer and Environmental University of Illinois. 1999. Disponível em <<http://hyg.ipm.illinois.edu/pastpest/199917a.html>> Acessado em 1 jan 2013.

COLE, B.M.S.; KOTOL, P.M.S.; HARING, M.B.S. Spawning and production of the lemon tetra *Hyphessobrycon pulchripinnis*. **Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication**, n.142, 1999.

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

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

COQUART, V; HENNION, M.C. Trace-level monitoring of chloroanilines in environmental waters using on-line trace-enrichment and liquid chromatography with UV and electrochemical detection. **Chromatographia**, v.37, n.7/8, p.392-398, 1993.

COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G.A. toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p. 1820-1830, 2008.

CYRINO, J.E.P.; SAMPAIO DE OLIVEIRA, A.M.B.M.; COSTA, A.B. **Curso – Introdução à Piscicultura**. Disponível em <<http://projelopacu.com.br/public/paginas/215-apostila-esalq-curso-atualizacao-em-piscicultura.pdf>> Acessado 13 em jan 2013.

DRUMMOND, C.D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Postovulatory follicle: model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, v.287, p.176-182, 2000.

DUTTA, H. M.; DALAL, R. The Effect of Endosulfan on the Ovary of Bluegill Sunfish: A Histopathological Study (*Lepomis macrochirus*). **International Journal of Environmental Research**, v.2, n.3, p.215-224, 2008.

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

EISLER, R. **Diflubenzuron hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review**. U.S. Fish Wildl. Ser Biol. Rep. ,Washington, D.C., v. 4, n. 25, p.1-36, 1992.

EPA (**Environmental Protection Agency**), 2006. Diflubenzuron, Pesticide tolerances. Rules and Regulation. Federal Register, 71 (229). <<http://www.epa.gov/EPA-PEST/2006/November/Day-29/p20147.pdf>> Acessado em 6 jun 2013.

FAN, FLUORIDE ACTION NETWORK. **Adverse Effects–Diflubenzuron CAS No. 35367-38-5**. Disponível em <<http://www.fluoridealert.org/pesticides/epage.diflubenzuron.effects.htm>> Acessado em 17 mar 2014.

FARIA, A.B.C. Revisão sobre alguns dos grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência**, v.5, p.345-358, 2009.

FERNICOLA, N.A.G.G.; BOHRER-MOREL, M.B.C.; BAINY, A.C.D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. RIMA/INTERTOX, p.221-242, 2003.

FERREIRA, E.B., CAVALCANTI, P.P., NOGUEIRA, D.A. (2013). ExpDes: Experimental Designs package. R package version 1.1.2.

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

FLYNN, M.N.; PEREIRA, W.R.L. Abordagem populacional na ecotoxicologia. **Revista InterTox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.4, n.3, p.79-91, 2011.

FORSQREN, K.L.; RIAR, N.; SCHLENK, D. The effects of the pyrethroid insecticide, bifenthrin, on steroid hormone levels and gonadal development of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) under hypersaline conditions. **General and Comparative Endocrinology**, v.186, p.101-107, 2013.

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

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

GOULART, A.M.A. **Efeitos toxicológicos do Dimilin® em machos adultos de *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae): Cl₅₀-96h e morfologia testicular**, 2012. 67 f. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

GOULART, M.D.C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, n.1, 2003.

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

GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, v.268, p.293-310, 2007.

GRIER, H.J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: **Proceedings of the 53 Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, 2002.

GRIER, H.J.; URIBE-ARANZÁBAL, M.C.; PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleost. In: JAMIESON, B.G.M. **Reproductive biology and phylogeny of fishes (Agnathans and Neoteleostomi). Phylogeny-Reproductive System-Viviparity-Spermatozoa**. Enfield: Science Publishers Inc, 2009. p.1-61.

GUYER, W.; NEUMANN, R. Activity and Fate of Chlorfluazuron and Diflubenzuron in the Larvae of *Spodoptera littoralis* and *Heliothis virescens*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.30, p.166-177, 1988.

HANDY, R.D. Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sublethal responses in fish and invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107C, n. 2, p.171-184, 1994.

HANRATTY, M.P.; LIBER, K. Evaluation of model predictions of the persistence and ecological effects of diflubenzuron in a littoral ecosystem. **Ecological Modelling**, v.90, p.79-95,1996.

HARMS, C.A. Parasitic diseases of aquarium and ornamental fish. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.5, n.2, p. 54-63, 1996.

HECKER, M; HOLLERT, H. Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. **Environmental Science and Pollution Research**, v.16, p.607-613, 2009.

HEIN, G. *Hyphessobrycon pando* sp. n., a new rosy tetra from northern Bolivia (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Bulletin of Fish Biology**, v.10, p.1-10, 2008.

HONJI, R.M.; NARCIZO, A.M.; BORELLA, M.I.; ROMAGOSA, E.; MOREIRA, R.G. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). **Fish Physiology and biochemistry**, v.35, p.109-123, 2009.

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

JOHNSON, E. New medications and diseases in the US ornamentals industry. **Aquaculture Health International**, n.6, p.15, 2006.

KIM, K.; KIM, Y.; KIM A. Biochemical evidence of the inhibitory effect of diflubenzuron on the metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mari*. Journal of **Asia-Pacific Entomology**, v.5, n.2, p.175-80, 2002.

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

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

LESTER, R.J.G.; HAYWARD, C.J. Phylum Arthropoda. In: WOO, P.T.K. **Fish diseases and disorders: Protozoan and metazoan infections**. v.1, 2ed. p.466-565, 2006.

LUVIZOTTO-SANTOS, R. **O Uso de Praguicidas nas Atividades Aquícolas: Destino e Efeitos após Aplicações em Tanques Experimentais e Avaliação nas Pisciculturas e Pesqueiros da Bacia do Rio Mogi-Guaçu**, 2007. 158f. Tese - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos-SP.

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 aquicultura no tratamento de ectoparasitoses - Restrições de uso. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária. **Anais**. 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**, v.148, p.265-272, 2008.

MARCON, L. **Efeitos do Thiodan® em fígado e em ovários em maturação avançada de lambaris *Astyanax bimaculatus***, 2013. 108f. Tese - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

MARCON, L. **Morfologia ovariana no lambaris *Astyanax bimaculatus* sob efeito do hormônio de crescimento**, 2008. 89f. Dissertação - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

MARQUES, D.K.S.; ROSA, L.L.; GURGEL, H.C.B. Descrição histológica de gônadas de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, n.3, p.573-582, 2000.

MARTINEZ, E.R.M; ALVES, A.L; SILVEIRA, S.M.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Cytogenetic analysis in the incertae sedis species *Astyanax altiparanae* Garutti and Britzki, 2000 and *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae) from the upper Paraná river basin. **Comparative Cytogenetics**, v.6, n.1, p.41-51, 2012.

MELO, R.M.C; MARTINS, Y.S.; TEIXEIRA, E.A.; LUZ, R.K.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Morphological and quantitative evaluation of the ovarian recrudescence in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after spawning in captivity. **Journal of Morphology**, v.275, p.348-356, 2014.

MERZENDORFER, H.; KIM, H.S.; CHAUDHARI, S.S.; KUMARI, M.; SPECHT, C.A.; BUTCHER, S.; BROWN, S.J.; MANAK, J.R.; BEEMAN, R.W.; KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.42, p.264-276, 2012.

MIRANDA, A.C.L; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. **Tissue & Cell**, v.31, n.5, p.480-488, 1999.

MISHRA, A.K.; MOHANTY, B. Effect of sublethal hexavalent chromium exposure on the pituitary-ovarian axis of a teleost, *Channa punctatus* (Bloch). **Environmental Toxicology**, v.27, n.7, p.415-22, 2010.

MPA, **Ministério da Pesca e Aquicultura**, Informações e Estatísticas. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/index.php/monitoramento-e-controle/informacoes-e-estatisticas>> Acessado em 1 jan 2013.

MURUA H.; SABORIDO-REY, F. Female reproductive strategies of marine fish species of North Atlantic. **Journal of Northwest Fishery Science**, v.33, p.33-54, 2003.

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

ORNE, S.; KEGLEY, S. **Pesticide database**. San Francisco, CA. 2007. Disponível em <<http://www.pesticideinfo.org>>. Acessado em 10 fev 2012.

PAN - Pesticide Database 2007. **Chemical Toxicity Studies on Aquatic Organisms**. Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org/List_EcoChemSpecies.jsp> Acessado em 31 jan. 2012.

PARENTI, L.R; GRIER, H.J. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony. **Integrative and Comparative Biology**, v. 44, p.333-348, 2004.

PASCHOALINI, A.L.; PERINI, V.R.; RIBEIRO, D.M.; FORMAGIO, P.S.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reproduction of *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae) in three section of Grande River basin, downstream Porto Colombia dam, south-eastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.11, n.3, p.615-623, 2013.

PATIÑO, R.; SULLIVAN, C.V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.26, p.57-70, 2002.

POST, G. **Textbook of fish health**. T.F.H. Publications, Neptune City, NJ, p.228,1987.

PRESTON, B.L. Indirect effects in aquatic ecotoxicology: Implications for ecological risk assessment. **Environmental Management**, v. 29, n. 3, p.311-323, 2002.

QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GRIER, H.; MAZZONI, T.S.; NÓBREGA, R.H.; AMORIM, J.P.A. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): Germline cysts, follicle formation and oocyte development. **Journal of Morphology**. v.272, p.1290-1306, 2011.

RAVAGLIA, M.A.; MAGGESE, M.C. Ovarian follicle ultrastructure in the teleost *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795), with special reference to the vitelline envelope development. **Tissue & Cell**, v.35, p.9-17, 2003.

SANTOS, H.B.; THOME, R.G.; ARANTES, F.P.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). **Theriogenology**, v.70, p.1449-1460, 2008.

SARASQUETE, C.; CÁRDENAS, S.; CANALES, M.L.G.; PASCUAL, E. Oogenesis in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L.: A histological and histochemical study. **Histology & Histopathology**, v.17, p.775-788, 2002.

SCHAEFER, C.H.; COLWELL, A.E.; DUPRAS JR., E.F. The occurrence of pchloroaniline and p-chlorofenylurea from the degradation of diflubenzuron and water and fish. California Mosquito and vector control association. In: Annual Conference, n. 48, p. 84-89. 1980.

SCHAEFER, C.H.; DUPRAS Jr., E.F.; STEWART, R.J.; DAVIDSON, L.W.; COLWELL, A.E. The accumulation and elimination of diflubenzuron by fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.21, p.249-254, 1979.

SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; SOARES, V.E. Praziquantel, levamisol e diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.1, p.53-59, 2009.

SCHALCH, S.H.C; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences** v.27, n.2, p.297-302, 2005.

SCHMITT-JANSEN, M.; VEIT, U.; DUDEL, G.; ALTENBURGER, R. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. **Basic and Applied Ecology**, v.9, p.337-345, 2008.

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://aquanic.org/publicat/state/il-in/as-503.htm> > Acessado em 13 jan 2013.

TAVARES-DIAS, M.; NEVES, L.R; SANTOS, E.F.; DIAS, M.K. R; MARINHO, R.G. B; ONO, E. A. *Perulernaea gamitanae* (Copepoda: Lernaecidae) parasitizing tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characidae) and the hybrids tambacu and tambatinga, cultured in northern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.988-995, 2011.

TIWARI, S.; CLAYSON, P.J.; KUHNS, E.H.; STELINSKI, L.L. Effects of buprofezin and diflubenzuron on various developmental stages of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Pest Management Science**, v.68, n.10, p.1405-12, 2012.

TRIPPIA, M.C.P.B. Influência da alimentação sobre o desenvolvimento gonadal e análise morfológica da maturação de *Hyphessobrycon callistus* (PEIXES, Teleostei). In: XII Encontro Brasileiro de Ictiologia. São Paulo, 1997. **Anais**. São Paulo: Instituto Oceanográfico da USP e Sociedade Brasileira de Ictiologia. p.338.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. 1999. **Diflubenzuron, tolerances for residues**. <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1999/April/Day-19/377.pdf>> Acessado em 3 dez 2012.

VALDEBENITO, I.; PAIVA, L.; BERLAND, M. Atresia folicular en peces teleósteos: una revisión. **Arquivos de Medicina Veterinária**, v.43, p.11-25, 2011.

VICENTE, E.; TOLEDO, M.C.F. Desenvolvimento de metodologia para determinação de 4-cloroanilina em frangos por cromatografia gasosa – espectometria de massas. Análise em tecidos tratados com digluconato de clorhexidina após processamento térmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.71-78, 2003.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis. Londres, p.321, 1996.

WALL, T. Disease and medicines: The welfare implications. In: BRANSON, E. J. **Fish Welfare**. p. 195-201. 2008.

WILDNER, D.D.; GRIER, H. QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Female germ cell renewal during the annual reproductive cycle in Ostariophysians fish. **Theriogenology**, p.1-16, 2012.

WOOD, A.W.; VAN DER KRAAK, G.J. Apoptosis and ovarian function: Novel perspectives from the teleosts. **Biology of Reproduction**, v.64, p.264-271, 2001.

XIAO, Q.; ZHANG, S.C.; ZHAO, B.S.; Toxic effects of nonylphenol on the gonad of adult rosy barb. **Huan Jing Ke Xue**, v.11, p.2580-5, 2007.