

JOELMA CRESPO MORAES

**EFEITOS DO THIODAN® (ENDOSULFAN) NAS BRÂNQUIAS DE
*Astyanax aff. bimaculatus***

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
2011**

JOELMA CRESPO MORAES

**EFEITOS DO THIODAN® (ENDOSULFAN) NAS BRÂNQUIAS DE
*Astyanax aff. bimaculatus***

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: 04 de agosto de 2011

Prof. Dr. Jorge A. Dergam dos Santos
(Co-orientadora)

Profª Drª. Ann Honor Munteer

Prof. Dr. Cláudio César Fonseca

Profª Drª. Marlene Isabel Vargas Vilorio

Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

“Pergunto coisas ao burití, e o que ele me responde é: a coragem minha. Burití quer todo o azul, mas não se aparta da água: carece de espelho.

Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende.”

Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas)

Dedico esta dissertação à minha família – pais, irmãs, filhos, marido, pelo apoio incondicional nesta etapa da minha vida, por estarem sempre ao meu lado, se dispondo e se empenhando com um único objetivo: me ajudarem a realizar um sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em sua infinita bondade, agradeço por guiar meus caminhos, por me dar entendimento, resignação, serenidade;

Aos meus pais, Tarcísio e Josélia, que me ensinaram a ter dignidade, honestidade e retidão para conduzir minha vida;

À minhas irmãs, Ivane e Silésia, que em muitos momentos se esqueceram de suas atividades diárias para estarem comigo sempre que precisei;

Aos meus filhos, Júnior e Álvaro, pelo carinho, amizade e desprendimento, sentimentos que me sustentaram em mais essa jornada da minha vida;

Ao meu marido José Antônio Elizeu, a quem devo mais essa conquista, pelo seu incentivo, por estar sempre ao meu lado, em silêncio, em paz, atento a todos os detalhes da minha jornada. Por mais que te agradeça, ainda assim não será suficiente;

Ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin, de maneira especial, pela sua orientação, condução técnica, apoio incondicional;

Aos meus co-orientadores, Professora Ann Honor e Professor Eduardo Paulino, por sempre me esclarecer dúvidas (não foram poucas). Mesmo com a agenda apertada pelos inúmeros compromissos, me atenderam sempre que precisei;

Aos professores dos Departamentos de Veterinária, Biologia Geral, Biologia Animal, Engenharia Civil, por me receberem e atenderem em todas as minhas solicitações;

Aos meus amigos e colegas, Paulo e Lucas, por me ajudarem e contribuírem para a elaboração desta dissertação;

Aos meus colegas, Marcus, Leandro, Vivian, Priscila, Mayara e Vinicius;

Às minhas amigas Angela, Elizete Maria e Bernadete, pelo apoio e amizade;

Aos professores da Escola Estadual Professor Mário Macedo, pois sempre que precisei me deram toda a assistência na escola;

À Rosi, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, com carinho e amizade;

Às minhas amigas de Viçosa, Sanely e Gláucia, pelo apoio e amizade;

Ao amigo Francisco Eustáquio Cavalier Matta, da Piscicultura da Prata, pelo fornecimento dos espécimes utilizados no experimento;

Por fim, a todos que de alguma maneira contribuíram para execução e finalização deste trabalho. Por mais que agradeça, por mais palavras usadas nestes agradecimentos, seguramente não serão suficientes. Nem sempre as palavras externam nossos sentimentos, nosso reconhecimento, admiração e respeito. Contudo, rogo a Deus que ilumine a todos, que lhes dê em dobro tudo aquilo que recebi durante esta caminhada. Foram muitos momentos difíceis, barreiras quase que intransponíveis, mas os bons momentos superaram todas as dificuldades.

A todos, muito obrigada...

BIOGRAFIA

Joelma Crespo Moares, filha de Tarcísio da Gama Moraes e Josélia Crespo Moraes, nascida em 11 de novembro de 1970, na cidade de Laranjal-MG, Zona da Mata Mineira. cursou o Ensino Fundamental e Médio e Técnico em Contabilidade na Escola da Comunidade Norberto Berno, Laranjal-MG. Graduiu-se em Ciências Biológicas na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras Santa Marcelina, Muriaé-MG. Pós-graduada em Avaliação de Flora e Fauna em Estudos Ambientais, pela Universidade Federal de Lavras (MG). Iniciou o Mestrado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa (MG) em março de 2009, titulando-se em agosto de 2011. Possui experiência em docência de Ensino Fundamental e Médio (Ciências e Biologia), em escola pública da rede estadual de Minas Gerais. Coordenadora e professora/tutora da Universidade do Norte do Paraná (Pólo EAD), Muriaé-MG, em cursos de graduação e pós-graduação. Trabalha com assessoria, consultoria e licenciamento ambiental de pisciculturas ornamental e de abate. Credenciada em Regularização de Reserva Legal, pelo Instituto Estadual de Florestas do Estado de Minas Gerais; Consultora ambiental.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA	3
Ecosistema aquático	3
Impactos dos agrotóxicos no ambiente aquático	4
Ecotoxicologia aquática	7
Inseticidas no meio ambiente: rotas de entrada	9
Avaliação de sensibilidade e estudos de toxicidade aquática	10
Thiodan®	10
Mecanismos de ação do endossulfan	12
Toxicidade aguda do Thiodan® (endossulfan)	13
Toxicidade aquática do Thiodan® (endossulfan)	13
Biomonitoramento, bioindicadores e biomarcador	14
Organismo teste	17
O uso do peixe como bioindicador	18
O lambari <i>Astyanax aff. bimaculatus</i>	19
Brânquias	21
O uso da brânquia como biomarcador	22
Objetivos	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
Referências bibliográficas	25
CAPÍTULO 2. USO DO LAMBARI (<i>Astyanax aff. bimaculatus</i>) COMO BIOINDICADOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: EFEITOS DO THIODAN® SOBRE AS BRÂNQUIAS	32
Introdução	32
Objetivos	34
Material e métodos	34
Normas de conduta para uso de animais na pesquisa	34
Local de realização do experimento	34
Animais	35
Agrotóxico	35
Determinação da CL ₅₀ -96h em sistema estático	35

Exposição subletal em sistema estático (96h)	36
Obtenção de dados biométricos	37
Análise de água	38
Avaliações morfológicas	39
Processamento para microscopia de luz	39
Análises morfométricas	39
Análises histopatológicas	40
Análises estatísticas	40
Resultados e discussão	43
CL ₅₀ -96h	43
Comportamento dos peixes expostos a concentrações subletais	45
Análise de água	46
Dados biométricos	50
Análises morfológicas	51
Análises histopatológicas	51
Análises morfométricas	53
Sistema vascular	53
Espessura das lamelas primárias	54
Quantificação de focos de hemorragia e diâmetro de aneurismas	56
Comprimento das lamelas secundárias	58
Proporção de tecido branquial	59
Quantificação de células de cloreto	60
Quantificação de células de muco	61
Diâmetro de células de cloreto e de células de muco	62
Conclusões	64
Referências bibliográficas	64
CONCLUSÕES GERAIS	70
ANEXOS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ATSDR – Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças
CEMIG – Companhia Energética de Minas Gerais
CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CICSU – *Committee of the Internacional Council of Scientific Unions*
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano
GABA – Ácido gama-aminobutírico
HCB – Hexaclorobenzeno
NBR – Norma Brasileira Regulamentadora
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCB – Bifenilas policloradas
SCOPE – Comitê Científico do ICSU sobre Problemas Ambientais

RESUMO

MORAES, Joelma Crespo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Efeitos do Thiodan® (endossulfan) nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus***. Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-orientadores: Ann Honor Munteer e Eduardo Paulino da Costa.

Um dos fatores de maior relevância na poluição ambiental e que compromete um ecossistema é a contaminação por agrotóxicos, principalmente quando esses são aplicados de forma indiscriminada. Entre esses compostos estão pesticidas que possuem diferentes composições químicas e são utilizados com diversas finalidades. O ambiente aquático tem sido considerado o mais relevante compartimento receptor de tóxicos, e por isso tem despertado interesse de pesquisadores para avaliação de indicadores biológicos. Assim, torna-se necessário a aplicação de métodos de avaliação dos efeitos dos poluentes utilizando peixes para demonstrar os primeiros sinais de estresse ambiental causados por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica. As alterações morfológicas dos órgãos de peixe com grande superfície de exposição ao meio ambiente, como as brânquias, podem ser úteis como biomarcadores. O Thiodan® (Bayer), um inseticida e acaricida amplamente utilizado para o controle de insetos chupadores e mastigadores, que apresenta ação por contato e ingestão, foi escolhido para o presente estudo. O uso de espécies de pequeno porte, como o lambari *Astyanax bimaculatus* facilita a execução dos testes em laboratório, motivo da escolha da espécie. O presente trabalho determinou a CL₅₀-96h e avaliou a influência do Thiodan® (Bayer) sobre a morfologia das brânquias de fêmeas da *A. bimaculatus* em maturação gonadal. Foram utilizadas 600 fêmeas de lambaris, divididas em cinco lotes, que permaneceram em sistema estático para determinação da CL₅₀-96h e para o teste de toxicidade. O primeiro lote de 120 animais, utilizado para a determinação da CL₅₀-96h, foi constituído de três repetições com cinco peixes cada para o grupo controle e para cada concentração de Thiodan® (1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0; 48,0 e 96,0 µg.L⁻¹). Os demais lotes foram distribuídos em quatro experimentos distintos (peixe sem adaptação e sem alimentação, peixes sem adaptação e alimentados, peixes adaptados e sem alimentação, e peixes adaptados e alimentados). Para cada experimento, utilizou-se um grupo controle e três diferentes concentrações de Thiodan® (1,3; 2,6 e 5,2µg/L), com três repetições de 10 peixes cada, durante 96h. Para estudos morfológicos e

morfométricos, fragmentos de brânquias foram processados seguindo técnicas de rotina. Os parâmetros indicadores da qualidade da água utilizada para a realização dos experimentos encontraram-se em conformidade com as condições exigidas pela Resolução 357/2005 (CONAMA) para cultivo e criação de peixes tropicais. A CL_{50-96h} obtida foi de $13,6\mu\text{g.L}^{-1}$ com intervalo de confiança de 10,1 a $18,4\mu\text{g.L}^{-1}$ ($P<0,05$). Durante os testes de toxicidade (96h), os grupos expostos apresentaram comportamento agressivo e tentativa de fuga na maior concentração ($5,2\mu\text{g.L}^{-1}$), agitação, nado errático e hiperventilação branquial em todas as concentrações nos quatro experimentos. Histologicamente observou-se hiperplasia, fusão lamelar, descolamento e destruição do epitélio lamelar. As análises morfométricas mostraram redução de número e diâmetro de células de cloreto, da espessura das lamelas primárias, e do comprimento das lamelas secundárias, entre e dentro dos experimentos ($P<0,05$). Também foi observado aumento do número de células de muco e dos pontos coincidentes com o tecido branquial ($P<0,05$) na maior concentração ($5,2\mu\text{g.L}^{-1}$) nos experimentos 1 e 2. Houve aumento ($P<0,05$) no diâmetro de aneurisma no experimento 1 em relação aos demais. No diâmetro de células de muco, na vasodilatação e na quantificação de foco de hemorragia entre os experimentos não houve diferença ($P>0,05$). A análise morfométrica mostrou que as alterações no experimento 1 (animais sem adaptação e sem alimentação) foram mais evidentes quando comparadas aos demais. Com base nesses resultados, pode-se concluir que as brânquias de *A. bimaculatus* podem ser utilizadas como biomarcadores de contaminação ambiental pelo Thiodan®.

ABSTRACT

MORAES, Joelma Crespo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Effects of Thiodan® (endosulfan) in the gills of *Astyanax aff. bimaculatus*.** Advisor: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisors: Ann Honor Mounter and Eduardo Paulino da Costa.

One of the factors most relevant in environmental pollution that involves the ecosystem is the contamination by pesticides, especially when these are applied indiscriminately. Between these compounds are pesticides with several chemical compositions that are used with different aims. The aquatic environment has been considered the most relevant toxic receptor compartment, and so has attracted attention of researchers for evaluation of biological indicators. Thus, it becomes necessary to use methods of assessment of the effects of pollutants using fish to show the first signs of environmental stress caused by contaminants in different levels of biological organization. The morphological disorders in fish organs with wide surface area exposures to the environment, such as the gills, may be useful as biomarkers. The Thiodan® (Bayer), an insecticide and acaricide widely used to control chewing and sucking insects was chosen for this study. The use of small species, such as lambari *Astyanax aff. bimaculatus*, facilitates the execution of laboratory tests, reason for the choice of these species. This study determined the LC_{50-96h} with 120 animals, divided in one as control group and seven concentrations of Thiodan® (1.5, 3, 6, 12, 24, 48 and 96 µg.L⁻¹) with three replicates of five fish each. Also it has been evaluated the influence of Thiodan® on the morphology of the gills of female *A. bimaculatus*. The fish were distributed in four separate experiments (fish without adaptation and without food, fish without adaptation and fed, fish adapted and without food, and fish adapted and fed). For each experiment were used a control group and three concentrations of Thiodan® (1.3, 2.6 and 5.2 µg.L⁻¹) lasting 96 hours, with three replicates of 10 fish in each aquarium. For morphological and morphometric studies, fragments of gills were processed following routine techniques. The water quality was measured and was according to the Resolution 357/2005 (CONAMA). The result of LC_{50-96h} was 13.6µg.L⁻¹ with a confidence interval from 10.1 to 18.4µg.L⁻¹ (P<0.05). During the toxicity tests (96h) the exposed groups showed aggressive behavior and escape attempt in the highest concentration (5.2µg.L⁻¹), restlessness, erratic swimming and branchial hyperventilation at all concentrations in four experiments. Histologically there was hyperplasia, lamellar

fusion, detachment and destruction of the lamellar epithelium. The morphometric analysis showed a reduction of number and diameter of chloride cells, the thickness of the primary lamellae, and the length of the secondary lamellae, within and between experiments ($P < 0.05$). It was observed an increase in the number of mucus cells and coincident points with the gill tissue ($P < 0.05$) in the highest concentration ($5.2 \mu\text{g.L}^{-1}$) in experiments 1 and 2. There was an increase ($P < 0.05$) in the diameter of the aneurysm in the experiment 1 when compared to the others. There was no difference ($P > 0.05$) in the diameter of mucus cells, vasodilation, and the amount of the hemorrhage focus between the experiments. Morphometric analysis showed that changes in experiment 1 were more evident when compared to others. Based on these results the experiment showed that the gills of *A. bimaculatus* can be used as biomarkers of environmental contamination by Thiodan[®] but the fish should not be used as bioindicator organism, because it has low sensibility to this product.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, um dos fatores de maior relevância quanto à poluição ambiental e que contribui para o desequilíbrio de um ecossistema, é a contaminação por poluentes como os agrotóxicos, principalmente quando esses são aplicados de forma indiscriminada e próximos a bacias hidrográficas (Rüegg et al., 1987).

Segundo Zagatto e Bertoletti (2008), a poluição aquática geralmente é consequência de descargas de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas, podendo ocorrer de forma intencional ou acidental, por atividade antrópica ou ainda por ocorrências naturais. Este último é um processo lento decorrente do carreamento de nutrientes originados na lixiviação dos solos, produtivos ou não e das bacias hidrográficas, pela água da chuva (Esteves e Barbosa, 1986).

A aplicação de agrotóxicos pode trazer consequências indesejáveis ao ambiente. Por isso, é preciso atentar para o uso indiscriminado desses produtos na agricultura moderna que vem desencadeando prejuízos para o meio ambiente e, em particular, no ecossistema aquático. Os resíduos dessas substâncias quando atingem o meio aquático podem permanecer dissolvidos na água, ser adsorvidos na matéria em suspensão, depositar-se no sedimento, acumular-se nos organismos vivos, degradar-se ou volatilizar-se. A dinâmica de interação dos agrotóxicos no ambiente aquático é complexa, sendo influenciada pela combinação das propriedades físico-químicas e biológicas no meio (Younos e Weigman, 1988).

Um desses agrotóxicos é o Thiodan® (endossulfan), inseticida acaricida organoclorado, do grupo químico éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico, bastante utilizado nas culturas de soja, cana-de-açúcar e café entre outras (Engelhardt e Sarmento, 2004).

A importância da utilização de peixes como bioindicador de toxicidade se deve a fatores econômicos e ecológicos (Tonissi, 1999; Bertoletti, 2000), isto é, peixes de pequeno porte são importantes para consumo humano e base trófica para peixes de médio porte e juvenis de espécies de grande porte, sendo de extrema importância para estudos de bioacumulação e ecotoxicologia, que servem de referência em programas de saúde para populações que dependem dessas fontes de alimento (Tonissi, 1999).

Uma das espécies utilizadas em estudos de toxicidade aquática é o *Astyanax bimaculatus* (lambari), peixe de pequeno porte, que atinge aproximadamente 20 cm de comprimento e com peso de até 40 gramas (Britiski et al., 1988; CEMIG/CETEC, 2000).

Entre os órgãos de peixes afetados negativamente pelos agrotóxicos e outros poluentes, estão as brânquias dos teleósteos, que desempenham várias funções, tais como trocas gasosas, regulação iônica, controle ácido-base e excreção de metabólitos nitrogenados (Evans et al., 2005), que são exercidas principalmente pelas células presentes nesse epitélio branquial.

O desempenho de funções vitais e o permanente contato com o ambiente aquático por meio de amplas superfícies de contato, tornam as brânquias sensíveis a ação de poluentes, podendo apresentar alterações morfológicas. Isso possibilita a utilização deste órgão como biomarcador (Rodrigues, 2007).

Dessa forma, foi estudado o lambari *Astyanax bimaculatus* como bioindicador de contaminação ambiental, em especial os efeitos do Thiodan[®] (endossulfan) sobre as brânquias desta espécie.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

Ecosistema aquático

A água é de fundamental importância para todo ser vivo e um dos elementos fundamentais para a sobrevivência dos organismos nos ecossistemas. Contudo, se houver contaminação por agrotóxicos, todos os demais componentes do ecossistema (bióticos ou abióticos) estarão contaminados, pois a água está presente em todas as partes (Machado Neto, 1991).

A crescente concentração da população em cidades gera a necessidade de captação de grandes volumes de água tratada, o que acarreta grande produção de efluentes que deveriam ser tratados antes de retornar à natureza (Almeida, 2006), evitando assim a contaminação do ecossistema aquático.

No Brasil, a água tem múltiplos usos; conforme destaca Tundisi (2003), as águas localizadas nas regiões interioranas do país representam enormes recursos disponíveis para recreação e turismo em larga escala. Isso, porque o lazer aquático ainda é uma atividade de baixo custo e desempenha papel econômico bastante significativo. Esse tipo de lazer existe em diferentes regiões que tem disponibilidade e abundância de água doce e de excelente qualidade, além do seu fácil acesso.

A atividade pesqueira é outra atividade econômica desenvolvida no Brasil que depende da qualidade da água, principalmente em rios de grande porte como são os da Amazônia. Nesse sentido, Agostinho et al. (1999) destacam que as construções de barragens de grande porte nas bacias hidrográficas brasileiras têm comprometido a biodiversidade e a atividade pesqueira em muitas regiões. Por outro lado, essas barragens podem ser utilizadas, para a geração e fornecimento de energia elétrica que é a finalidade principal, como também para a produção em larga escala de espécies produzidas em aquicultura, como o cultivo comercial de organismos aquáticos, plantas e animais.

A aquicultura demonstra sua importância pelo fato de aumentar a oferta de pescado que a pesca não é capaz de suprir. A pesca domina a produção atualmente, mas é globalmente visível o declínio desta atividade na maioria dos países. Isso porque os estoques naturais não são capazes de suprir as necessidades crescentes da população. Estima-se que haverá uma necessidade

global, de aproximadamente, 60 milhões de toneladas de peixe no ano 2025 (Edward e Demaine, 1998). Isto significa que a aquicultura deverá produzir três vezes mais que hoje, considerando o nível atual de consumo.

As principais aspirações de aquicultores incluem a produção de peixes em pequena escala para a subsistência, e ou promover a geração de renda. Sistemas aquícolas tradicionais funcionam principalmente para atender as necessidades domésticas, mas com a expansão rápida da economia de mercado, até mesmo em áreas distantes, fazendeiros terão o incentivo de obter renda com a produção de pescado (Edward e Demaine, 1998; Santos, 2005).

Impactos dos agrotóxicos no ambiente aquático

Agrotóxicos, agroquímicos, pesticidas, defensivos agrícolas, praguicidas, desinfetantes e biocidas são denominações dadas a substâncias ou misturas de substâncias, naturais ou sintéticas usadas para combater e erradicar pragas que podem consumir ou deteriorar materiais usados pelo ser humano, ou serem vetores de doenças transmitidas ao homem como também aos animais domésticos (Kataka e Zambrone, 2001). No Brasil, a denominação predominante para esses produtos é agrotóxico, conforme determinação legal - Lei nº 7.802/89 (BRASIL, 1989), pois esses produtos têm ação muitas vezes danosas no meio ambiente, agindo além do que é especificado.

Na sua origem, os agrotóxicos eram estáticos, ou seja, possuíam baixa solubilidade e tinham forte poder de adesão ao solo (Veiga et al., 2006). Com a evolução tecnológica, esses produtos passaram a ser mais solúveis em água, possuir baixa capacidade de adesão e serem mais voláteis. Essas inovações tecnológicas eram baseadas na manipulação de compostos químicos que criaram agrotóxicos cada vez mais persistentes e eficientes para combater as pragas; porém, também mais tóxicos. Com as novas alterações tecnológicas as características físico-químicas dos agrotóxicos prolongam o potencial nocivo, ocasionando danos à saúde humana e ao meio ambiente (Veiga et al., 2006).

Nas últimas décadas, houve grande desenvolvimento na síntese de novas substâncias químicas, e com isso, uma nítida e importante contribuição para o progresso da humanidade e para a melhoria da qualidade de vida. No entanto, muitas substâncias químicas são danosas para o homem e para o meio ambiente,

podendo causar problemas que, por vezes, somente são identificados após a ocorrência de casos graves e extremos. Entre as substâncias introduzidas no meio ambiente que poluem a água e contaminam a flora e a fauna aquática, encontram-se os inseticidas, fungicidas e herbicidas. Essas substâncias são destinadas ao uso na produção, armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas, nas pastagens, bem como em outros ecossistemas, em ambientes urbanos e industriais, para preservar a flora ou a fauna da ação danosa de outros seres vivos considerados nocivos, de acordo com a Lei nº 7.802, de 11.07.89 (BRASIL, 1989).

De acordo com Rodrigues e Almeida (2005), os agrotóxicos têm sido utilizados de maneira indiscriminada em programas de controle de plantas daninhas em grandes áreas agrícolas brasileiras. A utilização de agrotóxicos é muito comum devido ao baixo custo e eficiência comprovada no controle das plantas daninhas, se comparado aos demais métodos convencionais de controle (Santos et al., 2004; Barbosa, 2004).

Segundo Rosa (1998), a partir da década de 1980, foi bastante intensificado o uso de agrotóxicos, com o emprego de sementes melhoradas e máquinas agrícolas, época denominada de “Revolução Verde”, que impactou positivamente o aumento de produtividade principalmente de grãos, no Brasil. O impacto ambiental foi visível e o é até hoje, em consequência da modernização das lavouras, impactos muitas vezes irremediáveis, como por exemplo, a perda de biodiversidade e a exaustão de vários cursos d’água por assoreamento, além de contaminação por agrotóxicos.

Esses produtos tóxicos, com efeitos negativos prolongados, podem contaminar as águas diretamente, ou por despejo nos cursos hídricos, por transporte atmosférico em longas distâncias, ou por lixiviação de solos ou de vegetais contaminados (como é o caso dos pesticidas). A infiltração de pesticidas agrícolas nas águas subterrâneas tornou-se, no início dos anos 1990, uma grande preocupação para os produtores rurais (Vernier, 1994).

Quando aplicados na lavoura, uma parte dos agrotóxicos fica retida nos vegetais, frutos, sementes e vegetação rasteira, e a outra parte atinge o solo. Em função do potencial de mobilidade/degradabilidade, a substância pode ou não ficar retida no solo. Processos físicos, químicos, físico-químicos e/ou biológicos determinam a dissipação do agrotóxico no ambiente. O destino destes no ambiente é determinado por processos de retenção (adsorção, absorção), transformação

(degradação química e biológica) e transporte (volatilização, lixiviação e carreamento superficial), ou por interações desses processos (Spadotto et al., 2004; Zagatto e Bertolletti, 2008).

Assim, os agrotóxicos podem chegar aos corpos hídricos por meio das águas de lixiviação do solo. Caso parte do produto tenha volatilizado durante a aplicação, também pode chegar às águas fluviais por meio das águas de chuva (Spadotto et al., 2004; Zagatto e Bertolletti, 2008).

O destino final de determinado agrotóxico no ambiente aquático está relacionado à forma de sua aplicação no ambiente. A incorporação direta do agrotóxico no solo, por exemplo, apresenta baixa probabilidade de deriva quando comparado àqueles pulverizados nas culturas. A aplicação por pulverização apresenta maior risco de contaminação do ambiente aquático, pois fatores como vento, tamanho de gotículas, temperatura, altura da aplicação, volatilidade relativa e distância da aplicação, teor de matéria orgânica e argila no solo podem contribuir para maior ou menor deriva do agrotóxico para o corpo hídrico (Aguar e Moraes, 1999; Zagatto e Bertolletti, 2008).

A contaminação dos rios, represas e açudes por agrotóxicos utilizados na agricultura quase sempre ocorre devido ao carreamento pelas águas das chuvas, águas de irrigação ou erosão das partículas de solos tratados. Normalmente, a contaminação da rede hidrográfica ocorre devido à sua localização, geralmente na parte mais baixa do relevo e entremeada nas áreas agrícolas e pecuárias (Aguar e Moraes, 1999).

Os agrotóxicos utilizados na agricultura podem contaminar rios, represas, açudes e podem atingir o homem pela ingestão de água e de alimentos contaminados, como os peixes. Isso, porque os peixes entram em contato direto com os agrotóxicos, principalmente pela via epidérmica, que é a superfície externa do corpo com suas inúmeras estruturas sensoriais, brânquias, estruturas da cavidade oral, e todo o tubo digestivo (Fanta et al., 1997). Para que isso seja minimizado, e até mesmo evitado, devem ser tomadas algumas medidas preventivas e corretivas para que a fauna e flora aquática possam ser preservadas. Uma das medidas mais eficientes é através de estudos ecotoxicológicos, pois através deles são determinados limites aceitáveis de poluentes na água (Zagatto e Goldstein, 1991).

Esses estudos devem ser conduzidos para avaliar os efeitos tóxicos dos agrotóxicos na piscicultura, uma vez que além de controlarem os parasitos, estas substâncias podem causar efeitos tóxicos nos animais de produção.

Uma série de estudos tem retratado alterações de comportamento e alterações histológicas de diferentes órgãos estudados (Montoya, 2008; Santos, 2009; Silva Filho, 2010), indicando que o peixe pode absorver o pesticida diretamente da água, como também por ingestão do alimento contaminado. Os peixes de água doce, por exemplo, podem metabolizar uma grande variedade de pesticidas, o que representa uma ameaça constante a estes organismos, já que muitas vezes os metabólitos dos pesticidas são mais tóxicos que a substância que os origina.

Ecotoxicologia aquática

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, na reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU), em Estocolmo, pelo toxicologista René Truhaut. Após este evento foi formado o Comitê Científico do ICSU sobre Problemas Ambientais (SCOPE) (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Na década de 1970, toxicologistas e ecologistas perceberam que havia algo em comum entre essas duas disciplinas, mesmo considerando que os ecologistas não dominavam os conceitos básicos da toxicologia, e nem os toxicologistas dominavam os conceitos da ecologia. Com a associação dessas áreas do conhecimento, surge então uma nova ciência, a ecotoxicologia (Zagatto e Bertoletti, 2008).

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo. As características físico-químicas das substâncias, e as características biológicas do organismo, determinam a natureza bioquímica do efeito nocivo (Moraes et al., 1991).

A ecotoxicologia também foi definida por Ramade (1977) como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzido por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Conceitualmente, existem diversas interpretações, até mesmo inexatas, quanto aos princípios da ecotoxicologia, bem como da toxicologia. Por esse motivo, é necessário lembrar que a ecotoxicologia é uma ciência jovem quando comparada à toxicologia clássica (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Como já mencionado anteriormente, a água é um recurso indispensável à sobrevivência de todo e qualquer organismo vivo, além de ser fundamental a todas as atividades socioeconômicas. Ao abordar este tema, Tundisi (2003) destaca a real preocupação com a qualidade, quantidade e disponibilidade (uso e consumo) da água, que gradativamente sofre com a contaminação e escassez, caracterizando uma ameaça constante em todo mundo.

Outra preocupação dos ecotoxicologistas com o ambiente aquático é a presença de compostos com características lipofílicas e/ou persistentes, como os organoclorados, hexaclorobenzeno (HCB) e bifenilas policloradas (PCB), pois muitos são passíveis de bioconcentração e bioacumulação (Zagatto e Bertoletti, 2008).

O primeiro aspecto a ser considerado quando se avaliam efeitos induzidos por contaminantes químicos à biota (respostas biológicas) é que, nos sistemas aquáticos naturais, os organismos podem estar expostos não a um único contaminante, mas sim a uma miríade ou a uma mistura de diferentes substâncias ao mesmo tempo. Esses efeitos podem ser sinérgicos, quando um efeito combinado de dois contaminantes é muito maior do que a soma dos efeitos dos contaminantes individuais aplicados sozinhos; efeitos de potenciação, que ocorrem quando um contaminante tem efeito tóxico somente quando é aplicado conjuntamente com outro contaminante; efeitos antagônicos, que ocorrem quando dois contaminantes aplicados juntos interferem um no outro ou um interfere com outro contaminante que co-existe no meio; e, efeitos aditivos, quando o efeito combinado de dois contaminantes é igual a soma dos efeitos dos contaminantes individuais aplicados sozinhos (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Muitos tanques em pisciculturas estão com as águas contaminadas por agrotóxicos, o que geralmente decorre do escoamento superficial do entorno, uma vez que os praguicidas são empregados em diversas culturas, próximas aos tanques, além da utilização, muitas vezes sem prévia orientação sobre o manejo dos produtos por parte dos trabalhadores e produtores rurais que desconhecem os riscos que esses produtos oferecem à saúde humana e à dos animais, bem como

desconhecem ações alternativas que previnem a contaminação das águas (Eler et al., 2006). A contaminação pode comprometer a qualidade dos peixes das pisciculturas e, como consequência, retrair o desenvolvimento socioeconômico da região que depende desta cultura (Murty, 1988).

No entanto, não basta se preocupar apenas com a qualidade da água nos tanques das pisciculturas. É preciso atentar também para os efluentes gerados nos tanques, os quais devem ser monitorados, uma vez que contribuem para a poluição dos corpos receptores à jusante que abastecem outros municípios, ou ainda serem utilizados em outras atividades, como a irrigação, recreação e lazer (Murty, 1988; ATSDR, 2000).

De acordo com a Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR, 2000), a persistência de agrotóxicos no meio ambiente, é bastante variável, dependendo do grupo químico a que pertence e suas características físico-químicas, que usualmente mantêm a toxicidade do produto. A permanência (meia vida) desses agrotóxicos no ambiente vai depender do pH, oxigênio dissolvido e temperatura da água.

Inseticidas no meio ambiente: rotas de entrada

Embora o controle químico de pragas tenha reduzido o índice de doenças para homens e animais e incrementado a produção agrícola (Zambolim, 1999), agentes químicos podem permanecer ativos no meio ambiente por longos períodos, afetando os ecossistemas, muitas vezes de maneira irreversível.

O alcance e persistência desses contaminantes no ambiente podem ter como consequências efeitos negativos em organismos terrestres e aquáticos, bem como provocar intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, além do risco de intoxicação ocupacional de trabalhadores e produtores rurais (Borgá et al., 2007).

Segundo Queirós (2001), as principais vias de contaminação nos ambientes aquáticos são as aplicações diretas e a lixiviação do solo. Mas o problema se torna ainda mais grave quando aspersões são feitas sem controle de dosagem, quando galões desses produtos são lavados e aumentam a frequência das descargas dos resíduos de produtos nas águas naturais, ou ainda quando plantações são feitas próximas às margens dos rios. A falta de sistemas de drenagem possibilita aos

compostos alcançarem facilmente os corpos d'água pela ação das chuvas transportadas pelo escoamento superficial constitui outra via.

Duas rotas de entrada dos agrotóxicos podem comprometer a toxicidade aos organismos aquáticos: absorção ou ingestão. A transferência pela cadeia alimentar em alguns destes organismos, como em aves que se alimentam de peixes, e animais marinhos como focas, cetáceos, que são deficientes em metabolismo de desintoxicação, particularmente devido ao sistema de monoxigenases pouco desenvolvido, comprometem ainda mais a toxicidade por biomagnificação (Barron, 1995; Borgá et al., 2004).

Avaliação de sensibilidade e estudos de toxicidade aquática

Para se avaliar os efeitos nocivos de agentes físicos e químicos sobre os organismos representativos do ambiente aquático, normalmente são utilizados organismos testes com população homogênea, com sensibilidade definida, para determinar a concentração responsável por efeitos tóxicos letais, subletais, crônicos ou modificação do comportamento, entre outros, utilizando-se de sistemas de fluxo contínuo, semi-estático ou estático. De acordo com os organismos a serem avaliados, o meio aquático pode ser de água continental e marinha ou salobra, segundo as necessidades dos organismos avaliados (CETESB, 2006).

De acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2006), o estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre a vida aquática pode ser realizado por meio de ensaios biológicos *in loco* ou em condições laboratoriais controladas ou não, sendo os ensaios laboratoriais os mais utilizados, por permitirem um controle mais efetivo de fatores ocasionais, como temperatura, pH, duração de exposição, meio e concentração.

Thiodan®

Os inseticidas são classificados em quatro categorias de acordo com a fórmula química: organofosforados, organoclorados, carbamatos, e piretróides. Esses inseticidas caracterizam-se por diferentes graus de solubilidade em água, apresentam toxicidade variável entre os animais filogeneticamente mais evoluídos. Em alguns animais e plantas têm atividade sistêmica, têm baixa persistência no ambiente, com diferentes graus de degradação por enzimas e fatores químicos. A ação desses tóxicos (organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides) é

semelhante ao carbamato, agindo nas vias sinápticas dos axônios, inibindo a acetilcolinesterase (Ware, 2004).

O inseticida Thiodan[®] (Bayer) foi desenvolvido pela *Hoechst Aktiengesellschaft* na Alemanha, e introduzido no mercado em 1957 (Goebel et al., 1982; Stumpf e Abhaver, 1986). O ingrediente ativo endosulfan consiste na mistura de dois isômeros, sendo 70% de α -endosulfan e 30% de β -endosulfan, ciclodienos organoclorados (Figura 1). Entre os produtos derivados do metabolismo do endosulfan em mamíferos, o sulfato de endosulfan é o principal metabólito devido à sua importância toxicológica (Stumpf e Abhaver, 1986).

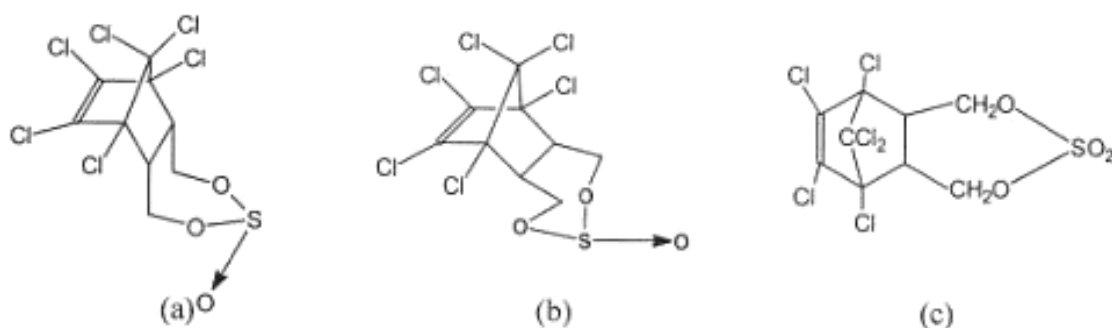


Figura 1: Estruturas moleculares: (a) α -endosulfan, (b) β -endosulfan, (c) endosulfan sulfato.

O Thiodan[®] (endosulfan) é um inseticida para o controle de insetos chupadores e mastigadores, com ação por contato e ingestão (Bayer, 2010). O endosulfan foi o único inseticida organoclorado amplamente utilizado no mundo todo (Capkin et al., 2006). Seu uso é recomendado especialmente em cultivos de café, cana, hortaliças, plantas cítricas, algodão, canola, girassol e forragens (Bayer, 2010) e seu uso e produção ainda encontram-se liberados no Brasil (BRASIL, 2008).

A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas vigente estabelece para resíduo de endosulfan em soja, o limite máximo de resíduo de $1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e período de carência de 30 dias (BRASIL, 2008). A advertência quanto ao seu uso é que se devem coletar frutos ou vegetais tratados até a partir de 21 dias após a última aplicação (BAYER, 2010). A sua importação e utilização serão proibidas a partir de julho de 2013 (BRASIL, 2010). Mesmo com a proibição do Thiodan (endosulfan) pelo Ministério da Agricultura, ainda assim, existe a preocupação com os resíduos que permaneceram no meio ambiente.

De acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005, considerando a qualidade da água definida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, em

atendimento à legislação brasileira vigente para resíduos de pesticidas, o valor limite de resíduo do referido inseticida e seus metabólitos nas águas doces é de 0,056 µg/L.

Mecanismos de ação do Thiodan®

Segundo Ware (2004), a transmissão de impulsos que ocorre no sistema nervoso é mediada por neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Um dos principais transmissores inibitórios no cérebro e medula espinhal é o ácido gama-aminobutírico (GABA). O mecanismo de ação dos organoclorados do grupo dos ciclodienos é como inibidor do quimiorreceptor GABA. Esse mecanismo consiste em um estímulo inibitório que leva a uma hiperpolarização da membrana do axônio por meio da permeabilidade dos íons de Cl⁻ e seu fluxo para o interior da membrana. Dowson (1977) explica que esse efeito inibitório bloqueia o neurotransmissor excitatório. Os ciclodienos ligam-se ao sítio de ligação dos canais receptores (GABA) individuais induzindo uma rápida mudança na formação do canal para o estado de dessensibilização, suprimindo o fluxo de Cl⁻ para o interior da membrana. Como consequência há uma propagação contínua do impulso nervoso, interferindo dessa forma na atividade nervosa animal gerando tremores, convulsões, prostração e, posteriormente a morte. Esses efeitos são observados tanto em insetos como em crustáceos, peixes e mamíferos, mesmo que expostos a baixas concentrações (Eto, 1990; Pinheiro et al., 1998). Vários autores (Ware, 2004; Coutinho et al., 2005) ressaltam que ao contrário do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), o efeito dos ciclodienos é diretamente proporcional à temperatura, ou seja, quanto mais alta a temperatura, mais tóxicos se tornam.

Singh e Canário (2004) relatam que endosulfan é um composto xenobiótico que se encontra na lista de substâncias que possuem a capacidade de interferir na ligação de hormônios nos seus receptores, alterando o ciclo hormonal nos animais e no homem (disruptores endócrinos). Esses mesmos autores observaram que em ratos, o endosulfan é um importante inibidor da síntese de andrógenos testiculares, e contribui para a diminuição intensa dos níveis de gonadotropinas plasmáticas (FSH e LH), junto com a testosterona plasmática e testicular.

Toxicidade aguda do Thiodan® (endosulfan)

Segundo a Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2000), o Thiodan® (endosulfan) pertence à Classe II, é altamente tóxico para animais aquáticos e terrestres, possui de moderado a alto risco, e efeitos agudos e crônicos.

De acordo com a *Environmental Protection Agency* (EPA, 1980), contaminações de pessoas, por endosulfan são provenientes em 53% dos casos pela ingestão de água contaminada e em 47% dos casos pelo consumo de alimentos a base de peixes contaminados. A mesma agência define valores de CL₅₀ aguda entre 0,17µg.L⁻¹ para truta arco-íris a 740µg.L⁻¹ para *Daphnia magna*.

Soares et al. (2003) afirmam que o endosulfan não é de fácil dissolução na água, adere ao solo, e sua degradação pode levar anos. Pinheiro et al. (1998) advertem, ainda, sobre o perigo de contaminação por produtos à base de endosulfan, como as regiões do Pantanal e da Amazônia, lugares ricos em recursos hídricos, pois este produto é extremamente tóxico para peixes e outros organismos aquáticos, mesmo em doses muito pequenas.

Toxicidade aquática do Thiodan® (Endosulfan)

Naqvi e Vaishnavi (1993) relatam que mesmo que os mecanismos de toxicidade do endosulfan sejam bastante estudados, existem poucos trabalhos com o objetivo de se avaliar efeitos histopatológicos desse agrotóxico em peixes.

Em estudo realizado por Capkin et al. (2006) foi determinada uma CL₅₀ de 19,78 µg.L⁻¹ de endosulfan para *Onchorhynchus mikyss* exposto ao tóxico por 24 horas. Montoya (2008), trabalhando com juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus*, encontrou o valor de CL₅₀ igual a 1,42µg.L⁻¹ para 96 horas. Musanhi (1987) determinou a CL₅₀ em 96, 48 e 24 horas de exposição ao endosulfan para tilápia nilótica adulta em águas temperadas, encontrando valores de 1,42; 3,80 e 10,3µg.L⁻¹ respectivamente. Silva Filho (2010) trabalhando com lambaris machos em exposição ao Thiodan®, 96 horas, determinou a CL₅₀ de 17,7µg.L⁻¹, em sistema de água estático.

Capkin et al. (2006) observaram, em *Onchorhynchus mikyss*, além da morte de 50% dos animais, convulsões, nado errático, edema e separação das lamelas branquiais, edema e necrose do fígado, dos túbulos renais e do tecido hematopoético. Cengiz et al. (2001) observaram lesões similares em brânquias do

peixe-mosquito *Gambusia affinis*, além de congestão e hipertrofia do fígado. Capkin et al. (2006), relataram em seus estudos que a alcalinidade e temperatura da água, além do tamanho dos peixes afetam a toxicidade do endosulfan.

Biomonitoramento, bioindicador e biomarcador

Atividades humanas têm exercido influência negativa nos peixes de água doce, seja em córregos, riachos, rios ou lagos. Os efeitos são os mais diversos possíveis em função da diversidade de poluentes liberados diretamente e descontroladamente nas águas, enquanto outros podem ser associados a mudanças no habitat, alterações de fontes de energia como também alterações nas bacias hidrográficas, das quais depende a biota (Capkin et al., 2006; Cengiz et al., 2001).

Percebe-se que são poucas as iniciativas existentes para avaliar e monitorar os efeitos das atividades humanas sobre o ecossistema aquático afetando as comunidades de peixes, e que permitam melhor determinação da qualidade da água e, por conseguinte, dos peixes.

Em países da Europa e nos Estados Unidos da América, esforços têm sido empregados para monitorar a qualidade da água, bem como a aplicação de legislações que impõem limites ao uso de contaminantes específicos usados em testes de toxicidade aguda. No entanto, esses esforços, ao que parece, não levam em conta a influência da variação geográfica, nem considera o efeito sinérgico de numerosos contaminantes ou os efeitos subletais em aspectos de biologia das espécies, como reprodução ou crescimento (Thurston et al., 1979).

O biomonitoramento tem por finalidade avaliar a extensão e a direção das respostas da comunidade biológica em função dos impactos ocorridos no meio ambiente. Estas avaliações podem ocorrer no campo, no laboratório ou em ambos (Armitage, 1996).

Quando se tem por objetivo avaliar a qualidade da água no nível de saúde do ecossistema, o ideal seria desenvolver um estudo em que obtivesse respostas de toda a comunidade aquática a um determinado estresse ambiental. No entanto, na prática, tal procedimento é impossível, pois, a maioria dos pesquisadores dessa temática, enfoca um setor do ecossistema, em particular o perifíton, o plâncton, o macrobentos ou os peixes (Silveira, 2004).

No monitoramento ambiental aquático, no caso de grandes distúrbios, o peixe tem a vantagem da rápida identificação por parte da sociedade. No entanto, existem algumas ressalvas quanto ao custo de técnica de monitoramento, como por exemplo, a técnica usada para medir a toxicidade total de um efluente, pois depende de quantidade de mão-de-obra especializada envolvida no processo, equipamentos com tecnologias avançadas, além de obstáculos, como o monitoramento de águas mais profundas e lugares com grandes correntezas. Mesmo assim, o peixe ainda é um dos melhores bioindicadores na detecção de contaminantes e poluentes na rede hidrográfica (Armitage, 1996).

Diferentes grupos de organismos indicam, distintamente, os efeitos da poluição compreendendo alterações diversas como mudança de comportamento e os vários níveis de alterações fisiológicas. Por isso, existe a necessidade de se fazer uma seleção prévia da população a ser utilizada na avaliação no processo de monitoramento das águas de rios (Rosenberg e Resh, 1993).

Para que avaliação seja feita, se faz necessário o uso contínuo de organismos vivos. No processo de monitoramento de águas, seguindo sistematicamente as etapas de avaliação (laboratório e campo) e a direção das respostas, é possível detectar os impactos ocorridos no meio ambiente (Armitage, 1996).

Vale ressaltar que o princípio básico do biomonitoramento é a comparação entre uma área de controle não impactada (ponto de referência) em relação a um local onde se quer avaliar a condição ambiental. Dessa forma para avaliar a qualidade da água de um rio, por exemplo, é preciso selecionar, pontos determinantes com e sem interferência antrópica, mantendo sempre o nível de altitude similar para que as variações naturais (umidade, temperatura e tamanho do rio), sejam as mínimas possíveis. Quanto aos pontos de coleta, deverão ser respeitados especificamente, três critérios: pontos de coleta no próprio local (ponto de referência), acima do local que supostamente foi impactado (pontos a montante) e pontos de coleta abaixo do local impactado (pontos a jusante) (Armitage, 1996; Cengiz et al., 2001; Capkin et al., 2006).

Seguindo essas regras básicas, com os recursos necessários e por meio dos resultados é possível viabilizar a restauração do rio que está sendo avaliado. É um processo de longo prazo e um trabalho de biomonitoramento contínuo.

O termo bioindicador é usado de forma ampla, incluindo qualquer medida que possa refletir a interação entre o sistema biológico e um agente ambiental, que pode ser físico, químico ou biológico. Este termo tem ganhado aceitação cada vez maior e pode ser definido como qualquer resposta a uma exposição, efeito ou susceptibilidade dos indivíduos aos agentes estressores ambientais (Azevedo e Chasin, 2004).

Bioindicadores de exposição ou de dose interna indicam a exposição de um organismo a uma ou mais substâncias químicas, mas não fornece informação sobre o grau de efeito adverso que essa exposição pode causar. As medidas podem ser concentrações do agente químico no alimento, na água e no ar, bem como a exposição de um indivíduo ou população (Azevedo e Chasin, 2004).

Os efeitos adversos num sistema biológico só serão produzidos a partir do alcance do agente a um sítio específico por tempo suficiente para produzir uma manifestação adversa das comumente encontradas. Sendo assim, o bioindicador de exposição reflete a distribuição do agente químico ou seus produtos de biotransformação no organismo (Azevedo e Chasin, 2004).

Bioindicadores de efeito são aqueles que demonstram efeitos adversos no organismo, por meio da medida de parâmetro bioquímico, fisiológico, comportamental ou outra alteração que, dependendo da quantidade da exposição, pode ser reconhecida como associada ao possível enfraquecimento do estado de saúde do indivíduo ou caracterizado como doença. No entanto, vale ressaltar que certos bioindicadores de efeitos irreversíveis podem ser úteis ou oportunizar uma intervenção clínica precoce (OMS, 1993a).

Bioindicador de susceptibilidade é um indicador de habilidade adquirida do organismo, pois responde aos desafios de exposição a uma substância específica, xenobiótica. Vários fatores (idade, dieta ou estado de saúde) podem influenciar a susceptibilidade de um indivíduo exposto a um ou mais agentes químicos. São fatores preexistentes e independentes da exposição, são predominantemente genéticos na origem, embora doenças, mudanças fisiológicas, medicação e exposição a outros agentes ambientais que podem alterar a suscetibilidade individual (OMS, 1993b).

Biomarcadores podem ser definidos como alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente, e

podem ser usados para identificar sinais iniciais de danos aos peixes. Além disso, pode sugerir relações de causa e efeito entre a exposição aos contaminantes e os efeitos observados no organismo, e permitir avaliar os efeitos integrados do estresse químico nos peixes (Walker et al., 1996).

Em estudos de toxicidade, biomarcadores em nível sub-orgânico (bioquímico, fisiológico e histológico) têm sido utilizados e considerados mais viáveis para avaliar as respostas aos estressores, permitindo, ainda, uma avaliação mais rápida da saúde dos organismos. Os biomarcadores são classificados em três classes: de exposição, são os que estimam a dose interna ou disponibilidade de um xenobiótico particular ou de seus metabólitos em um organismo exposto; de efeitos, não fornecem informações sobre sua natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cessar sua atuação; e, de suscetibilidade que podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de respostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (Mayer et al., 1992).

Organismo teste

No Brasil, são poucas as espécies de organismos aquáticos empregados em testes ecotoxicológicos com métodos padronizados (Bertoletti, 2000), apesar de ser crescente o uso de peixes pela sua importância na cadeia alimentar e pela facilidade de serem obtidos. Esses animais têm sido usados em testes ecotoxicológicos a fim de se prever o risco de acidentes ou intoxicações não intencionais resultantes do uso de agrotóxicos, reconhecidos pelos impactos e efeitos negativos causados sobre os organismos-alvo, como também em outros elementos do ambiente (Küster, 2005).

Os peixes estão entre os grupos taxonômicos que podem ser utilizados como organismos-teste, pois são os que mais despertam a sensibilidade de leigos, tanto pela fácil visibilidade, como também pelo interesse comercial e recreacional das espécies de maior porte (Bertoletti, 2000). Estudos têm mostrado que os peixes podem absorver impactos dos agrotóxicos diretamente pela água e pela ingestão de alimentos contaminados. A superfície corpórea e as brânquias são regiões de absorção primária, sendo que depois de assimilados, os agrotóxicos podem ser

encontrados no sangue ou distribuídos pelos tecidos, aspectos já relatados na literatura há vários anos (Rand e Petrocelli, 1995).

Para a escolha de um organismo-teste existe uma série de critérios a serem seguidos, como por exemplo, a sensibilidade, ou capacidade do organismo de responder a uma variedade de contaminantes; a facilidade de manutenção em laboratório, uma vez que o organismo deverá ser adaptável às condições de cultivo; a reprodutibilidade dos resultados, onde a repetição dos experimentos deverá fornecer resultados uniformes, com limites de erros aceitáveis; a relevância, pois o organismo deverá ter significado ecológico ou econômico em função de sua importância na cadeia alimentar; e o ciclo de vida de curta duração, que facilita o tempo de condução dos testes (Rand e Petrocelli, 1995).

O uso do peixe como bioindicador

Bioindicadores são espécies capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (Adams, 2002). Nas últimas décadas, os bioindicadores têm sido usados na avaliação de toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas (Oliveira Ribeiro et al., 2005).

A exposição de peixes por longos períodos em ambientes menos degradados pode resultar na morte de alguns indivíduos dentro de uma população ou, ainda, em prejuízos bastante visíveis. Períodos reduzidos de exposição a estressores ambientais podem resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam habilidades do peixe em realizar suas funções fisiológicas. Por outro lado, quando peixes e outros organismos são expostos a ambientes muito degradados, os efeitos dos poluentes podem ser drásticos e, quando a concentração de poluentes é aguda, pode haver mortalidade quase instantânea (Jobling, 1995; Pacheco e Santos, 2002).

O número de trabalhos onde peixes são empregados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos está cada vez maior (Pacheco e Santos, 2002; Thophon et al., 2003; Barcarolli e Martinez, 2004). O uso de espécies de pequeno porte facilita a execução dos testes em laboratório. Entre as espécies mais utilizadas em ensaios ecotoxicológicos estão *Chirodon notomelas* (piquira), *Hemigrammus marginatus* (bandeirinha), *Hyphessobrycon callistus* (mato-grosso), *Danio rerio* (paulistinha ou peixe-zebra), *Poecilia reticulata* (guarú ou lebiste)

(Bertoletti, 2000). Além dessas espécies, tem sido também usado lambari (*Astyanax bimaculatus*) um peixe de pequeno porte (Britisk, 1972), como bioindicador.

O lambari *Astyanax* aff. *bimaculatus*

O lambari (*Astyanax bimaculatus*), conhecido popularmente pelos nomes de lambari do rabo amarelo, piaba, lambari-guaçu, mojarra, é um Characiforme que pertence à família Characidae, até então uma das espécies da subfamília Tetragonopterinae (Figura 2). No entanto, revisões recentes colocam o gênero em “Incertae sedis”, com 88 gêneros e 620 espécies, sendo que 86 espécies pertencem ao gênero *Astyanax* (Lima et al., 2003). Apresenta-se amplamente distribuído no país, sendo observado também na bacia do rio Paraíba do Sul região do presente estudo. É encontrado em cabeceiras de riachos, rios e lagos, e vive sempre em cardumes, realizando curtas migrações na época das cheias para sua reprodução (CEMIG/CETEC, 2000).



Figura 2: Lambari do rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*).

O *A. bimaculatus* é um peixe de pequeno porte, atingindo aproximadamente 10cm de comprimento e pesando até 40g. Possui corpo irregularmente elíptico, com nadadeiras amarelas, quatro a cinco dentes na série externa e cinco na série interna do pré-maxilar, escamas com reflexos prateados, mancha umeral ovalada, pedúnculo caudal com mancha alongada que se prolonga até a ponta dos raios caudais medianos (CEMIG/CETEC, 2000).

O lambari do rabo-amarelo é uma espécie com potencial para a piscicultura (Hayashi et al., 2004) e o gênero *Astyanax* tem recebido atenção especial devido sua rusticidade, rápido crescimento, hábito alimentar onívoro, carne saborosa e também por ser utilizado como isca viva na pesca. Alimenta-se de algas, vegetais, sementes, larvas e insetos adultos (Britski, 1972), e é de extrema importância em diversos habitats por equilibrar o ecossistema e a cadeia alimentar, constituindo-se em fonte de alimentos para peixes maiores, espécies carnívoras e aves.

Na natureza, possui como características reprodutivas a fecundação externa, sem cuidado com a prole. O período reprodutivo se prolonga de setembro a março, a desova é parcelada (, 1996) e pode variar conforme a espécie e o habitat (Pelizaro et al., 1981; Miranda et al., 1996).

Devido à pressão antrópica sobre os ecossistemas ser cada vez mais acentuada, principalmente pela poluição e uso exacerbado dos recursos naturais, esses ambientes sofrem bruscas alterações, e assim, inibem ou mesmo impossibilitam os ciclos reprodutivos das espécies que tendem a diminuir suas populações ou mesmo extinguirem-se. Vários estudos (Motta e Uida, 1995; Suarez et al., 1995; Esteves, 1998;) têm demonstrado a importância do lambari na estrutura trófica do ecossistema e sua variação alimentar diante de alterações ocorridas nos ambientes aquáticos. Trabalho realizado por Loureiro et al. (1995) verificando a dieta alimentar na espécie *Hoplias malabaricus* (traíra) no reservatório da UHE de Segredo (PR), observaram que, preferencialmente, os hábitos alimentares são os lambaris de diversas espécies. Novakowski et al. (2007) também relataram em seu estudo com lambaris, sua importância como alimento para as espécies *Hoplias malabaricus*, *Oligosarcus longirostris* e *Rhamdia branneri* após o represamento do Reservatório de Salto, Caxias (PR). Lambaris são de grande importância em diversos habitats como consumidores secundários. Além disso, são peixes de interesse alimentar para outros peixes consumidores terciários (Esteves, 1998).

Vários fatores interferem na dinâmica da população desses peixes (Vitule e Aranha, 2002). O *A. bimaculatus* é uma das poucas espécies capazes de sobreviver em condições adversas. Por isso, esta espécie apresenta enorme potencial para se tornar um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos (Paiva et al., 2006).

Brânquias

Os teleósteos possuem quatro pares de arcos branquiais, que se compõem de lamelas primárias e numerosas lamelas semicirculares denominadas lamelas secundárias, que estão alinhadas em toda a extensão de ambos os lados da lamela primária. A lamela primária é constituída de uma base cartilaginosa, um sistema vascular e um tecido epitelial estratificado (Takashima e Hibiya, 1995), composto por diversos tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, as células secretoras de muco e as células de cloreto, além de botões gustativos e células de suporte não diferenciadas (Machado, 1999).

Entre essas células há um segundo tipo epitelial denominado epitélio respiratório, que recobre as lamelas respiratórias. Este é constituído de uma única camada de células pavimentosas, nas quais ocorrem trocas gasosas entre o sangue e o meio. O epitélio respiratório está apoiado sobre uma lâmina basal e esta, sobre um grupo de células chamadas células pilares. O arranjo dessas células permite a formação de canais por onde circula o sangue. As células secretoras de muco se encontram principalmente nas bordas das artérias aferentes e eferentes das lamelas primárias. As células de cloreto são grandes e repletas de mitocôndrias que são importantes no processo de transporte ativo de íons; estas se encontram principalmente nas lamelas primárias. Essas células são acidófilas e estão presentes em grande quantidade em peixes marinhos, sendo escassas em peixes de água doce (Takashima e Hibiya, 1995).

Acredita-se que o transporte de íons em peixes de água doce ocorra por um sistema que acopla a captação de Na^+ à excreção de NH_4^+ e H^+ e a captação de Cl^- ao efluxo de HCO_3^- . Esse transporte ocorre na célula de cloreto e depende da enzima Na-K-ATPase (Evans, 1987; Perry, 1997).

A lamela secundária é formada por uma dupla camada de células epiteliais sustentadas por células contráteis separadas por capilares (Takashima e Hibiya, 1995).

O sistema vascular das brânquias é constituído por sistema artérioarterial e arteriovenoso. O sistema arterial é formado por artérias eferentes e aferentes nas lamelas primárias e capilares sanguíneos na lamela secundária. O sistema arteriovenoso é composto por uma veia central e veias aferentes e eferentes paralelas às artérias aferentes e eferentes das lamelas primárias. A veia central

ocupa toda a extensão da lamela primária ao longo da base cartilaginosa (Machado, 1999).

O espaço entre as lamelas e a espessura das mesmas varia de acordo com cada espécie e seu nível de atividade. A circulação do sangue dentro da lamela se dá em um sentido, e a circulação da água fora da lamela ocorre no sentido contrário, formando um sistema de contracorrente. Esse sistema de contracorrente permite uma maior habilidade na troca gasosa. A água que passa pelas brânquias tem pouco oxigênio, mas cruza com o sangue que entra nas brânquias, com menos oxigênio (pressão parcial de oxigênio menor). A medida que o sangue passa pelas lamelas secundárias das brânquias, ele vai recebendo mais oxigênio por difusão da água que entra nas lamelas, que sempre tem maior pressão parcial de oxigênio. Este sistema permite retirar uma maior quantidade de oxigênio da água (Baldisserotto, 2002).

As brânquias dos teleósteos desempenham várias funções, como trocas gasosas, regulação iônica, controle ácido-base e excreção de metabólitos nitrogenados (Evans et al., 2005). Essas funções são exercidas principalmente pelas células presentes no epitélio, que são alvo da ação de poluentes em peixes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área superficial muito grande, representada pelas lamelas secundárias (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994).

O uso da brânquia como biomarcador

Os biomarcadores são hoje definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais. Além disso, promovem oportunidade para determinar quando as condições fisiológicas estão fora da faixa de homeostase normal (Zagatto e Bertoletti, 2008).

Atualmente, biomarcadores teciduais vêm sendo utilizados para documentar e quantificar tanto a exposição quanto o efeito dos poluentes (Winkaler et al., 2001; Pacheco e Santos, 2002; Veiga et al., 2006).

As células presentes no epitélio branquial são fundamentais no conjunto de respostas fisiológicas necessárias à manutenção da homeostase do organismo frente às alterações ambientais, principalmente por estarem em contato direto com o

meio ambiente (Arellano et al, 2004; Evans et al., 2005). Como consequência, o epitélio branquial tem sido utilizado como modelo em vários estudos realizados em laboratório ou em ambientes naturais, para avaliar sua utilização na determinação dos efeitos de xenobióticos sobre organismos aquáticos, bem como na determinação da qualidade do ambiente aquático.

Alberto et al. (2005) aplicaram este conceito na análise do epitélio branquial do *Astianax fasciatus* proveniente de dois trechos do rio Camanducaia, São Paulo, e observaram alterações provocadas pelo esgoto doméstico. Em laboratório, ensaios com pesticidas como endosulfan (Capkin et al., 2006; Freitas, 2009) e deltametrina (Cengiz, 2006; Cengiz e Unlu, 2006), e com metais como o alumínio em diferentes pHs (Jagoe e Haines, 1997) e metais pesados como cobre (Mazon et al., 2002) têm sido amplamente utilizados com o objetivo de se tentar especificar a ação de cada composto nas células do epitélio branquial.

Os efeitos nas estruturas das células e tecidos, segundo Fent (1996), constituem um importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos. As características histopatológicas de órgãos alvos específicos podem expressar condições ambientais e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (Schmalz et al., 2002).

Wester e Canton (1991) relatam que através da morfologia é possível tanto revelar os órgãos alvo mais afetados quanto detectar a sensibilidade do organismo em relação aos níveis tóxicos dos contaminantes aos quais foram expostos. A histopatologia permite, ainda, diferenciar lesões promovidas por doenças daquelas induzidas por outros fatores ambientais como a exposição a poluentes (Schwaiger et al., 1997).

As patologias identificadas nas brânquias podem ser divididas em três ramos principais. O primeiro deles apresenta mudanças regressivas, que abrangem edema epitelial, vacuolização, necrose das lamelas secundárias, morte de células secretoras de muco com excessiva secreção de muco nas lamelas primárias, entre outros processos oriundos de uma resposta inflamatória em defesa ao agente. No segundo, observam-se as anomalias circulatórias que se caracterizam por um processo de congestão vascular, aneurisma lamelar e presença de exsudato fribroso nos capilares sanguíneos do epitélio lamelar secundário. Há também

mudanças progressivas, como hipertrofia de células epiteliais e secretoras de muco, e fusão lamelar (Takashima e Hibiya, 1995).

A histopatologia de brânquias é uma importante ferramenta para se poder definir o órgão como um biomarcador, uma vez que essas estruturas estão em contato direto e constante com a água do meio. As brânquias formam o sistema respiratório dos peixes, e estão organizadas de forma a realizar as trocas gasosas necessárias de forma eficiente. Para que isso ocorra, é necessária a exposição de um sistema de capilares à água, fato este que torna o tecido extremamente vulnerável em relação ao meio ambiente. Partículas como sedimentos, parasitas e/ou xenobióticos podem, dessa forma, causar efeitos prejudiciais às brânquias mais facilmente (Rossi, 2008).

Estudos mostram que microscopia de luz das brânquias é reconhecida como um método de observação rápido e válido para determinar os danos causados pela exposição a diferentes poluentes nos peixes, sendo as células de cloreto uma importante ferramenta em tais estudos (Garcia-Santos et. al., 2007; Pereira e Caetano, 2009).

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos do inseticida organoclorado Thiodan[®] (endosulfan) nas características morfológicas da brânquia de fêmeas de lambaris *Astyanax bimaculatus* em maturação gonadal após exposição aguda a esse agrotóxico.

Objetivos específicos

- Estimar a CL₅₀ para o inseticida organoclorado Thiodan[®] (endosulfan) em fêmeas adultas de *Astyanax bimaculatus* em maturação gonadal; e
- Comparar microscopicamente a estrutura das brânquias de animais mantidos como controle com aqueles submetidos à ação do agrotóxico Thiodan[®] durante o período experimental, para avaliar os possíveis efeitos toxicológicos desse agrotóxico sobre a população pela avaliação morfológica e morfométrica das brânquias.

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, 2006. 19 p.
- ADAMS, M. (Eds). **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Maryland: American Fisheries Society Bethesda, 2002. 600p.
- AGUIAR, L. H.; MORAES, G. Hepatic alanine and aspartic amino transferases of the freshwater teleost. *Brycon cephalus* (Matrinchá) exposed to the organophosphorous methyl parathion (folidol 600 registred). **Fish response-tootoxic-environments Kennedy**, Canadá, 1999. p. 145-152.
- ALBERTO, A.; CAMARGOS, A. F. M.; VERANI, J. R.; COSTA, O. F. T.; FERNANDES, M. N. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, p. 247-255, 2005.
- ALMEIDA, F. G. **Importância estratégica da água para o terceiro milênio**. 2006. Disponível em: www.uff.br/geographia/ojs/index.php/.../87. Acesso em: 03/03/2010.
- ARELLANO, J. M; STORCH, V; SARASQUETE, C. Ultrastructural and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, p. 452-460, 2004.
- ARMITAGE, P. D. The application of a classification and prediction technique based on macroinvertebrates to assess the effects of river regulation. SILVEIRA, M. P. **Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 68p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 36).
- ATSDR – *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*. **Toxicological profile for endosulfan**. 2000. Disponível em: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles. Acesso em: 12/05/2010.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Interfox, 2004. 340p.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002. 212 p.
- BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminum in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 72, p. 639-646, 2004.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.
- BARRON, M. G. Biocummulation and bioconcentration in aquatic organisms. In D. J. Hoffman et al. (Eds). **Handbook of ecotoxicology**, Boca Raton: Lewis, 1995. pp. 652-666.
- BAYER. Thiodan® (endosulfan). Disponível em: www.bayercropscience.com.br. Acesso em: 09/03/2010.
- BERTOLETTI, E. **Estimativa de efeitos tóxicos crônicos com *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae)**. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1118 p. 2000.
- BORGÁ., K.; FISK, A. T.; HOEKSTRA, P. F.; MUIR, D. C. G. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, p. 2367-2385, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte e o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br>. Acesso em 05/03/2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ato nº 12 de 01 de abril de 2008**. Publicado no Diário Oficial da União de 03/04/2008, Seção 1, p.6. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/Legislacao>. Acesso em: 06/07/2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução RDC nº 28 de 9 de agosto de 2010**. Diário Oficial da União de 16/08/10, Seção 1, p. 64. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/Legislacao>. Acesso em: 06/07/2010.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguaí. **Poluição e Piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, p.79-108, 1972.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. Brasília: Câmara dos Deputados/CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 143p.,1988.

CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, v. 64, p.1793-1800, 2006.

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

CENGIZ, E. I.; ÜNLÜ, E.; BALCI, K. The histopathological effects of Thiodan® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Scientific Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. v. 36, p. 75-85, 2001.

CENGIZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p.200-204, 2006.

CENGIZ, E. I.; UNLU, E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, p. 246-253, 2006.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Informações Ecotoxicológicas**. 2006. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br. Acesso em: 10/10/2010.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357**, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/Legislacao>. Acesso em: 06/07/2010.

COUTINHO, C.F.B.; TANIMOT, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pesticides Science**, v. 8, p. 651-660, 1977.

EDWARDS, P.; DEMAINE, H. **Rural Aquaculture: Overview and Framework for Country Reviews**. Regional Office for Asia and the Pacific Food and Agriculture Organization of the United Nations. Bangkok, Thailand. p. 234. 1998.

ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. G.; NOGUEIRA, A. M.; MILANI, T. J. Presença de agrotóxicos na água de mananciais e lagos de pesca em pesqueiros situados na bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu. **Anais IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**. São Pedro, SP. 221 p., 2006.

EPA – *Environmental Protection Agency*. (1980). Toxicology Network. Endosulfan factsheet. **EPA-440/5-80-046**. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov>. Acesso em: 12/02/2010.

ENGELHARDT, G. T.; SARMENTO, R. **Comportamento ambiental do thiodan CE (endosulfan) usado no controle químico da broca do fruto do cafeeiro**. 26p. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo. Disponível em: www.seculodiario.com.br. Acesso em: 10/07/2009.

ESTEVES, F. A.; BARBOSA, F. A. R. Eutrofização artificial. A doença dos lagos. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 56-61, 1986.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência. 575p., 1998.

ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: **Chemistry of plant protection**, Berlin: Springer-Verlag. v. 6, 65-107, 1990.

EVANS, D. H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives**, v. 71, p. 47-58, 1987.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiology Review**, v. 85, p. 97-177, 2005.

FANTA, E.; MOREIRA, A.; SILVA, S. O. Histopatologia do fígado e das brânquias do peixe *Oreochromis niloticus* submetido a diferentes doses de Folidol 600. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 10, p. 84-142, 1997.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v.26, p.3 -10, 1996.

FREITAS, V. R. **Avaliação morfofisiológica dos efeitos do Thiodan® sobre as brânquias de tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) jovens**. Relatório final de bolsa de iniciação científica PIBIC-CNPq/UFV, 2009.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 376-381, 2007.

GOEBEL, H.; GORBACH, S.; KNAUF, W.; RIMPAU, R. H.; HÜTTENBACH, H. **Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide endosulfan**. New York: Springer-Verlag, 174 p. 1982.

HAYASHI, C.; MEURER, F.; BOSCOLO, W. R.; LACERDA, C. H. F.; KAVATA, L. C. B. Frequência de arraçoamento para alevinos de lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.21-26, 2004.

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. Londres: Chapman & Hall. 1995. 455p.

JAGOE, C. H; HAINES, T. A. Changes in gill morphology of atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environmental Pollution**, v. 97, p. 137-146, 1997.

KATAKA, E. T.; ZAMBRONE, F. A. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos**. Campinas: ILSI Brasil, 2001. 160p.

KÜSTER, E. Cholin-and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assesment. **Aquatic Toxicology**, v. 75, p. 76-85, 2005.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, H.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO,

V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. p. 106-169, 2003. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 2003.729p.

LOUREIRO, V. E.; HAHN, N. S.; ABUJANRA, F.; RUSSO, M. R.; FIGUEIREDO, H. R. Dieta e atividade alimentar de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (Osteichthyes, Erthinidae) do reservatório da UHE de Segredo, PR, no primeiro ano de sua formação. In: **Anais... XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia. 1995.

MACHADO NETO, J. G. **Ecotoxicologia de agrotóxicos**. Jaboticabal: FUNEP, 49p., 1991.

MACHADO, M. R. The use of fish gills as indicators of water quality. UNOPAR **Científica, Ciências e Biologia da Saúde**, Londrina, v. 1, p. 63-76, 1999.

MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.; MCKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; McCUME, D. C.; RATTNER, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, cap. 4, p. 155-196, 1992.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research Section A**, v. 88, p. 52-63, 2002.

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

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

MORAES, E. C. F.; SZNELWAR, R. B.; FERNICOLA, N. A. **Manual de toxicologia analítica**. São Paulo: Roca, p. 229, 1991.

MOTTA, R. L.; UIDA, V. S. Hábito alimentar da comunidade de peixes de um ambiente lótico tropical (Peixes dos riachos da cuesta de Botucatu). In: **Anais... XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1995.

MURTY, A. S. **Toxicity of pesticides to fish**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, v. 1, 1988. 178 p.

MUSANHI, R. G. Influence of two organochlorine pesticides, Thiodan and Lindane on survival of fingerlings of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. United Nations Development Program - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**. 1987. Disponível em: <http://www.fao.org> Acesso em: 15/06/2010.

NAQVI, S. M.; VAISHNAVI, C. Bioaccumulative potential and toxicity of endossulfan insecticide to non-target animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 347-361, 1993.

NOVAKOWSKI, G. C.; HAHN, N. S.; FUGI, R. Alimentação de peixes piscívoros antes e após a formação do reservatório de Salto Caxias, Paraná. **Revista Brasileira de Biota Neotropical**, v. 7, p.149-157, 2007.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue nature reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 53-69, 2005.

OMS – Organização Mundial da Saúde. *Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas*. Serie de Informes Técnicos 797. Geneva: OMS, 1993a. Disponível em: www.who.int/idex.html. Acesso em: 12/03/2009.

OMS – Organização Mundial da Saúde. *Investigacion de botes de enfermedades ambientales*. Manual de entrenamiento. Geneva: Switzerland, 1993b. 53p.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 331-347, 2002.

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

PELIZARO, M. G.; LEME DOS SANTOS, H. S.; LOPES, R.A.; CASTAGNOLI, N. 1981. Rhythm of development in the oocyte of the Tambiu *Astyanax bimaculatus* (Reinhardt, 1874) (Pisces: Characidae) a morphometric and histochemical study. **Arch. Biol.**, 92, 415–431.

PEREIRA, B. F.; CAETANO, F. H. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. **Micron**, v. 40, p. 783-786, 2009.

PERRY, S. F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 325-47, 1997.

PINHEIRO, S.; NARS, N. Y.; LUZ, D. **Agricultura ecológica e a máfia dos agrotóxicos no Brasil**. Rio de Janeiro: Edição dos Autores, 1998.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDIZIG, V. Fish gills as monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. United Nation: Fishing News Books, Cap. 30, p. 339-352, 1994.

QUEIRÓS, S. C. N. **Determinação multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em detecção por espectrometria de massas e novos solventes para extração em fase sólida**. Tese (Doutorado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2001. 291p.

RAMADE, F. **Ecotoxicologia**. (Trad.). Paris: Ed. Masson, 1977. 201 p.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: _____. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. London: Hemisphere Publishing Corporation, cap. 1, p. 1-28, 1995.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: Grafmarke, 2005. 591p.

RODRIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidade)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 139p. 2007.

ROSA, A. V. **Agricultura e meio ambiente**. São Paulo: Ed. Atual, 1998. p.10-17.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates**. New York: Chapman & Hall, 488p., 1993.

ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei)**. [Dissertação de Mestrado em Farmacologia]. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008. 65p.

RÜEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C. M.; ÚNGARO, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; YOKOMIZO, Y.; LMEIDA, W. F. Impactos dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. In: MARTINE, G. & GARCIA, R. C. (Eds.). **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Ed. Caetés, p.171-207, 1987.

SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; SANTOS, E. A.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**. v. 22, p. 323-330, 2004.

SANTOS, J. B. **Atividade microbiana após aplicação de herbicidas utilizados no cultivo do feijoeiro**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 63p. 2005.

SANTOS, D. C. M. **Toxidez aguda do zinco em *Lambaris Astynas aff. Bimaculatus*** (Linnaeus, 1758). Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 111p. 2009.

SCHMALZ, W. F.; HERNANDEZ, A. D.; WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Marine Environmental Research**. v. 54, p. 539-542, 2002.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluated contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 75-86, 1997.

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

SILVEIRA, M. P. **Aplicação do biomonitoramento para avaliação da qualidade da água em rios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 68p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 36).

SINGH, P. B.; CANÁRIO, A. V. M. Reproductive endocrine disruption in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. In: response to the pesticide γ -hexachlorocyclohexane. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 58, p. 77-83, 2004.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 1117-1127, 2003.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.(Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

STUMPF, K.; ABHAVER, J. **An up-to-date review of the environmental chemistry of endosulfan**. Frankfurt: HOECHST, 1986. 23 p. (Report B 81/86).

SUAREZ, Y. R.; SOUZA, R.; PEREIRA, R. A. C. Ecologia alimentar de *Astyanax bimaculatus* (CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE), no canal do Tamengo Corumbá, MS. In: **Anais... XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1995.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology**. Normal and pathological features. 2 ed. New York: Fisher, 1995. 195p.

THOPHON, S.; KRATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121, p. 307-320, 2003.

TONISSI, F. B. **Avaliação ecotoxicológica do reservatório de Salto Grande, Americana-SP, com subsídio para análise da qualidade ambiental do sistema**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999. 130 p.

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. São Paulo: RIMA/IIIE, 2003. 248 p.

THURSTON, R. V.; RUSSO, R. C.; FETTEROLF-Jr., C. M.; EDSALL, T. A.; BARBER-Jr., Y. M. (eds.), **A review of the EP Red Book. Quality criteria for water**. Water quality Sec., American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 1979. 313p.

, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Ed. UEM, 1996. 196p.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública** [online]. v.22, p. 2391-2399, 2006.

VERNIER, J. **O meio ambiente**. Campinas: Papirus, 1994. 125p.

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

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

WESTER, P. W.; CANTON, J. H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**: v.100, p.115-117, 1991.

WARE, G. W. **The pesticide book**. Fresno/Califórnia: Thompson Publ CA, 2004. 340 p.

WINKALER, E. U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

YOUNOS, T. M.; WEIGMAN, D. L. Pesticides: a continuing dilemma. **Journal WPCF**, v. 60, p. 1199-1205, 1988.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Editora Rima, 2008. 478 p.

ZAGATTO, P. A.; GOLDSTEIN, E. G. Toxicidade em águas do Estado de São Paulo. **Ambiente**, v.5, p.13-20, 1991.

ZAMBOLIM, L. Fungicidas: benefícios versus riscos. **Ação Ambiental**, v.2, p.24-27, 1999.

CAPÍTULO 2

USO DO LAMBARI (*Astyanax aff. bimaculatus*) COMO BIOINDICADOR DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL: EFEITOS DO THIODAN® SOBRE AS BRÂNQUIAS

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o uso indiscriminado de agrotóxicos provocou efeitos danosos ao meio ambiente, comprometendo substancialmente a sobrevivência do ser humano, resultando em altos níveis de degradação dos ecossistemas.

Quando lançados no ecossistema aquático, agrotóxicos como o Thiodan®, um acaricida organoclorado, podem aderir ao material orgânico em suspensão, depositar no sedimento ou serem absorvidos pelos organismos. O Thiodan®, produto escolhido para o presente estudo, é classificado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2010) como Classe II (altamente tóxico). Sua formulação é do tipo concentrado emulsionável, contendo dois isômeros, o α -endosulfan (70%) e o β -endosulfan (30%), que podem ser biotransformados em sulfato de endosulfan (Correa et al., 2001). A concentração de ingrediente ativo é de 350g.L^{-1} de endosulfan, considerado perigoso, inflamável e corrosivo (Engelhardt e Sarmiento, 2009). O endosulfan não dissolve facilmente na água e adere às partículas do solo, levando anos para sua degradação (Soares et al., 2003).

O lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), conhecido popularmente pelos nomes de lambari do rabo amarelo, tambuí, piabas, lambari-guaçu, mojarra e matupiris, era classificado na ordem Characiformes, família Characidae, sendo uma das espécies da subfamília Tetragonopterinae (Britski, 1972; CEMIG/CETEC, 2000). No entanto, revisões recentes colocam o gênero em "Incertae sedis". A antiga subfamília Tetragonopterinae continha 88 gêneros e 620 espécies, sendo que 86 espécies pertencem ao gênero *Astyanax* (Lima et al., 2003). Os representantes de distribuição mais ampla dos lambaris são os lambaris-do-rabo-vermelho (*A. fasciatus*) e os lambaris-do-rabo-amarelo (*A. bimaculatus*) (Araújo e Simoni, 1997). *Astyanax bimaculatus* é, na verdade, um complexo de espécies de ampla distribuição nas Américas do Sul e Central (Paiva et al., 2006).

Como características morfológicas o *A. bimaculatus* apresenta coloração castanha clara no dorso, ventre prateado e nadadeiras amarelas; possui uma mancha oval escura na região umeral, e uma mancha alongada no pedúnculo caudal, estendendo-se até os raios medianos da nadadeira caudal. Possui quatro a cinco dentes na série externa e cinco na série interna do pré-maxilar (Buckup, 2003).

A espécie é encontrada em diversos ambientes, vivendo em cardumes. Apresenta fecundação externa e desova parcelada entre os meses de setembro a março, tamanho de primeira maturação gonadal de 5 a 6,9 cm (Vazzoler, 1996; Duke, 2003), hábito alimentar onívoro, principalmente no período diurno, alimentando-se de insetos, peixes e sementes de vegetais superiores. Constitui-se em espécie forrageira, é importante para a pesca esportiva, como também para diversos *habitats* por equilibrar o ecossistema aquático e a cadeia alimentar (CEMIG/CETEC, 2000; Vitule e Aranha, 2002).

Por esses motivos, o *A. bimaculatus* apresenta enorme potencial para se tornar um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos (Duke, 2003; Paiva et al., 2006).

O lambari *A. bimaculatus*, como a maioria dos teleósteos, possui quatro pares de arcos branquiais que se compõem de lamelas primárias e numerosas lamelas semicirculares denominadas lamelas secundárias, que estão alinhadas em toda extensão de ambos os lados da lamela primária. A lamela primária é constituída de uma base cartilaginosa, um sistema vascular e um tecido epitelial estratificado (Takashima e Hibiya, 1995), composto por diversos tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, as células secretoras de muco e as células de cloreto, além de botões gustativos e células de suporte não diferenciadas (Machado, 1999).

O desempenho de funções vitais e seu permanente contato com o ambiente aquático, por meio de amplas superfícies de contato tornam as brânquias órgãos sensíveis à ação de poluentes (Polksic e Mitrovic-Tutundizic, 1994; Pawert, Müller, Tribskorn, 1998; Fracácio, 2001; Tribskorn, 2002).

Os efeitos dos poluentes sobre a estrutura branquial em peixes têm sido estudados com frequência, em ambientes poluídos ou expostos a testes em laboratório, e as alterações histopatológicas utilizadas como um importante indicador da contaminação aquática (Karan et al., 1998; Pacheco e Santos, 2002; Mazon et al., 2002; Fanta et al., 2003). Com isso, as brânquias podem exibir modificações que

são consideradas respostas de defesa, visto que algumas levam ao aumento da distância entre o meio externo e o meio interno, diminuindo assim a área da superfície em contato com o poluente. A dificuldade para a difusão do poluente para o meio interno, ao mesmo tempo provoca uma redução na difusão dos gases respiratórios, podendo provocar hipóxia no peixe (Mallat, 1985; Fernandes e Mazon, 2003).

Assim, o presente trabalho tem por finalidade, verificar se o endosulfan altera o arranjo morfológico da estrutura branquial em *Astyanax bimaculatus* sob exposição aguda a este agrotóxico.

OBJETIVOS

- Determinar a concentração letal para 50% da população de fêmeas de lambaris *Astyanax bimaculatus* em maturação avançada (CL₅₀-96h) expostas ao Thiodan[®] durante 96h, em sistema de água estático; e
- Comparar a estrutura das brânquias de animais mantidos como controle com aqueles submetidos à ação do agrotóxico Thiodan[®] durante o período experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Normas de conduta para uso de animais na pesquisa

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária/UFV, sob o número 26/2011.

Local de realização do experimento

O experimento foi conduzido nos Departamentos de Veterinária e de Biologia Geral, e na Divisão de Água e Esgoto, da Universidade Federal de Viçosa. Os peixes foram mantidos no Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária, onde se realizou a determinação da CL₅₀, o teste de toxicidade aguda, e as atividades de coleta, fixação e inclusão dos fragmentos das brânquias. As etapas de microtomia, coloração de lâminas histológicas e as análises histológicas e morfométricas foram realizadas nos Departamentos de Veterinária e de Biologia Geral. Na Divisão de Água e Esgoto foram realizadas as análises de parâmetros físicoquímicos da água.

Imagens digitais das lâminas histológicas foram obtidas em fotomicroscópios no Departamento de Veterinária e no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) da UFV.

Animais

Foram utilizadas 600 fêmeas maduras do lambari *Astyanax bimaculatus*, com 8 a 11 cm de comprimento total, mantidas em tanques de terra na Piscicultura da Prata, Eugenópolis/MG (21°05'56"S e 42°11'13"O), sub-bacia do rio Pomba, bacia do rio Paraíba do Sul.

Os peixes foram transportados para o Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária, e mantidos em aquários com capacidade de 50 litros numa densidade de 1g de peixe por litro de água. Foi utilizada água livre de cloro, temperatura controlada em $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ por meio de aquecedores e termostatos 150W, com monitoramento duas vezes ao dia. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por malha acrílica, circulação de água por meio de bombas para aeração contínua da água garantindo o bem-estar dos peixes. Os animais foram alimentados com ração contendo 36% de proteína, duas vezes ao dia, de acordo com o manejo da piscicultura.

Agrotóxico

Para a avaliação proposta no presente experimento, foi utilizado o inseticida organoclorado Thiodan[®] (Bayer) em sua apresentação comercial com 350g/L de endossulfan. A literatura mostra que diferentes doses desse produto são utilizadas em estudos experimentais.

Determinação da CL₅₀-96h em sistema estático

O teste de concentração letal (CL₅₀) que avalia a concentração responsável pela mortalidade de metade dos animais foi realizado em sistema de água estático (ANBT, 2006) com os animais mantidos sob restrição alimentar desde 24 horas antes do início e durante todo o teste. Essa restrição alimentar foi realizada para evitar acúmulo de matéria orgânica que poderia interferir na ação do agrotóxico.

Para o teste foram selecionadas 120 fêmeas maduras. Foram utilizadas três repetições com cinco peixes cada para cada concentração de Thiodan[®] (BAYER,

2010), sendo um grupo controle e sete grupos contendo 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0; 48,0 e 96,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

As concentrações foram distribuídas em recipientes plásticos com 1,5 litros de água dos próprios aquários. Para obter as diferentes concentrações, o Thiodan[®] foi diluído uma primeira vez 1:100 (Solução Intermediária), e uma segunda vez 1:100 (Solução Final).

O início do teste foi dia 16/01/2010 às 10:00 horas, com término às 10:00 horas do dia 20/01/2010. A verificação de mortalidade foi realizada a cada seis horas (de zero até 96 horas).

Para acompanhamento da temperatura, foram adicionados 1,5 litros de água do mesmo aquário, em um recipiente idêntico, de forma que qualquer variação na temperatura pudesse ser medida sem provocar estresse adicional a nenhum grupo.

O programa utilizado para o cálculo da CL_{50} foi o TOXCALC, determinando o valor e intervalo de confiança pelo método PROBIT, Versão 1.5, fornecedor USEPA ($P < 0,05$).

Exposição subletal em sistema estático (96h)

Depois de estimar a CL_{50} para os peixes, foi realizado o teste de toxicidade subletal com o Thiodan[®] (endossulfan) baseando-se nas normas técnicas para teste em sistema estático da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2009).

O teste de toxicidade aguda foi feito com três diferentes concentrações (1,3, 2,6 e 5,2 $\mu\text{g/L}^{-1}$) inferiores à CL_{50} e, para fins estatísticos, cada concentração, incluindo-se o grupo-controle, teve três repetições sob as mesmas condições, constituídos cada um por 30 animais. Durante o teste foi quantificada a mortalidade e o comportamento dos animais que sobreviveram à intoxicação, e os efeitos sobre a morfologia da brânquia dos peixes expostos.

Os lotes de 120 peixes cada foram destinados à ação do tóxico em quatro diferentes experimentos, conforme tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos experimentos.

Experimentos	Descrição	Início	Término
Experimento 1	Peixes sem adaptação e sem alimentação.	22/02/2010	26/02/2010
Experimento 2	Peixes sem adaptação e alimentados duas vezes ao dia.	15/03/2010	19/03/2010
Experimento 3	Peixes com adaptação de 10 dias e sem alimentação.	19/04/2010	23/04/2010
Experimento 4	Peixes com adaptação de 10 dias e alimentados duas vezes ao dia.	17/05/2010	21/05/2010

Os peixes dos experimentos 3 e 4 passaram por período de adaptação de 10 dias no biotério, o que possibilitou a comparação entre os grupos adaptados (Experimentos 3 e 4) e os não adaptados (Experimentos 1 e 2) expostos às diferentes concentrações do Thiodan® (1,3; 2,6 e 5,2 $\mu\text{g/L}^{-1}$) inferiores à CL_{50} .

O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas, e a temperatura da água ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$) controlada com auxílio de termômetros e termostatos.

Quando alimentados, os peixes receberam ração comercial contendo 36% de proteína, duas vezes ao dia, de acordo com o manejo adotado na piscicultura. Por se tratar de um sistema estático, não foram realizadas limpezas nem troca de água dos aquários durante o período experimental (96h), para não interferir com a cinética natural das concentrações do tóxico na água. Quanto aos animais mantidos sem alimento, o objetivo foi evitar o acúmulo de matéria orgânica, o que poderia interferir nos parâmetros da qualidade da água e na partição do tóxico.

Obtenção de dados biométricos

Após as 96h foram obtidos dados biométricos (Tabelas 2, 3 e 4) e coletadas brânquias de seis peixes de cada aquário. Os animais foram previamente anestesiados com solução de benzocaína 1:10.000 (Benzocaína, USP, Synth) seguindo-se eutanásia por aprofundamento da anestesia e secção na transição cabeça-tronco. Após a eutanásia, foram registrados comprimento padrão, comprimento total e peso corporal. As medidas de comprimento, em centímetros, foram obtidas com paquímetro, e o peso corporal, em gramas, determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g.

Tabela 2. Valores médios de comprimento padrão (em cm) de fêmeas de *A. bimaculatus* em maturação avançada em cada grupo experimental.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	8,3±0,7 ^{Aa}	7,8±1,3 ^{Aa}	7,1±1,3 ^{Aa}	6,8±0,4 ^{Aa}
1,3µg.L ⁻¹	8,7±0,6 ^{Aa}	7,2±0,6 ^{Aa}	7,1±0,6 ^{Aa}	8,7±1,1 ^{ABa}
2,6µg.L ⁻¹	8,1±0,5 ^{Aa}	6,8±0,5 ^{Aa}	7,1±0,5 ^{Aa}	8,1±0,9 ^{ABa}
5,2µg.L ⁻¹	6,8±1,4 ^{Aa}	7,4±0,4 ^{Aa}	7,3±0,5 ^{Aa}	9,1±0,5 ^{Ba}

Valores expressos como média±desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes (P<0,05).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes (P<0,05).

Tabela 3. Valores médios de comprimento total (em cm) de fêmeas de *A. bimaculatus* em maturação avançada em cada grupo experimental.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	11,4±4,0 ^{Aa}	9,2±1,5 ^{Aa}	8,2±1,3 ^{Aa}	8,0±0,4 ^{Aa}
1,3µg.L ⁻¹	10,2±0,7 ^{Aa}	8,8±0,6 ^{Aa}	8,3±0,9 ^{Aa}	10,0±1,9 ^{ABa}
2,6µg.L ⁻¹	9,7±0,6 ^{Aa}	8,3±0,7 ^{Aa}	8,3±0,6 ^{Aa}	9,4±1,3 ^{ABa}
5,2µg.L ⁻¹	8,2±1,1 ^{Aa}	8,9±0,6 ^{Aa}	8,3±0,4 ^{Aa}	10,4±0,6 ^{Ba}

Valores expressos como média±desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes (P<0,05).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes (P<0,05).

Tabela 4. Valores médios de peso corporal (em gramas) de fêmeas de *A. bimaculatus* em maturação avançada em cada grupo experimental.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	14,3±2,0 ^{Aa}	9,8±4,0 ^{Aa}	9,0±4,9 ^{Aa}	7,6±2,2 ^{Aa}
1,3µg.L ⁻¹	16,0±3,9 ^{Aa}	8,6±2,4 ^{Aa}	9,0±2,0 ^{Aa}	15,3±5,9 ^{ABa}
2,6µg.L ⁻¹	13,7±3,9 ^{Aa}	6,0±2,2 ^{Aa}	9,0±2,5 ^{Aa}	13,4±5,2 ^{ABa}
5,2µg.L ⁻¹	8,7±5,4 ^{Aa}	11,2±2,5 ^{Aa}	9,8±1,9 ^{Aa}	18,4±3,3 ^{Ba}

Valores expressos como média±desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes (P<0,05).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes (P<0,05).

Análise de água

No início de cada repetição experimental, foi tomada uma amostra da água que abasteceu os 12 aquários para identificar as condições físico-químicas da água em que os experimentos foram conduzidos. Ao final de cada repetição experimental, foi coletado um *pool* de cada concentração para que fossem analisados os mesmos parâmetros. As análises foram realizadas na Divisão de Água e Esgoto da UFV.

Os parâmetros aferidos pelo método analítico padrão (Eaton et al., 2005) foram pH, para monitorar a acidez que influencia o estado das brânquias e a toxicidade total; cor aparente, que indica a quantidade de sólidos dissolvidos; turbidez (Unidades Nefelométricas de Turbidez - UNT), que indica a quantidade de sólidos totais em suspensão na água; cloro molecular(Cl_{2aq}), para garantir que o uso da água tratada para consumo humano não provocasse um efeito oxidante na água; cloretos (Cl_{aq}⁻), para determinar a salinidade da água; oxigênio dissolvido (OD) e

demanda bioquímica de oxigênio (DBO) para controle da toxicidade proveniente da degradação da matéria orgânica presente na água; e dureza (total, Ca^{2+} e Mg^{2+}), para verificar a solubilidade da atividade do endosulfan.

A temperatura da água foi aferida duas vezes ao dia ao longo do período experimental. A alimentação foi suspensa 24h antes do início de todos os experimentos, sendo que nos experimentos 1 e 3 perdurou durante todo o teste. Nos experimentos 2 e 4 foi mantida a alimentação evitando o estresse nos animais pesquisados.

Avaliações morfológicas

Processamento para microscopia de luz

Para o estudo das características morfológicas das brânquias, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 10% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2. O material foi fixado por um período mínimo de 24 horas e preservado em álcool 70%. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para solução de álcool 95% por quatro horas. Após isso, os fragmentos de brânquias foram imersos em solução de álcool 95% e resina glicolmetacrilato (Leica, Historesin) na proporção de 1:1 por 12 horas, seguida de resina pura por 24 horas, e inclusão.

Após a inclusão foram feitas as secções semi-seriadas com $3\mu\text{m}$ de espessura em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2050), utilizando-se navalhas de vidro. As secções histológicas foram utilizadas para descrição das características morfológicas e análises morfométricas nos grupos controle e nos grupos tratados. Foram feitas seis lâminas com quatro cortes cada do fragmento da brânquia. O material foi corado com azul de toluidina/borato de sódio 1%, montado com Entellan[®] (Merck), e analisado em microscopia de luz (microscópio Olympus BX-50).

Análises morfométricas

Para análises morfométricas foram realizadas, em cada animal, medidas da espessura de quatro lamelas primárias em três regiões distintas (base, terço médio e ápice), comprimento das lamelas secundárias e vasodilatação das lamelas primárias nas mesmas regiões, e identificação e quantificação dos focos de hemorragia entre essas lamelas primárias (Figuras 1 e 2). As imagens digitais foram capturadas por meio de câmera digital Zeiss SC-020 acoplada a fotomicroscópio Olympus CX31

(DVT/UFV), em objetiva de 4X. As análises morfométricas foram conduzidas utilizando o programa *Image-Pro Plus 4.5*.

Nas mesmas quatro lamelas primárias, as imagens digitais foram capturadas por meio de câmera Feldmann Wild Leitz, FWL DIGI-PRO 50M acoplada a fotomicroscópio Nikon Eclipse E600 (Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do Bioagro/UFV), com objetiva de 40X. Foram fotografados seis campos ao acaso por animal, em cada grupo para a quantificação de células de muco e de cloreto, de aneurisma e pontos coincidentes com o tecido branquial (Figuras 3, 4 e 5). Para esse fim, foi utilizado um retículo micrométrico com 1 mm² de área no programa *Image-Pro Plus 4.5*.

Com o mesmo programa foi medido o diâmetro de 40 células de cloreto, 40 células de muco e 10 aneurismas identificados por experimento em cada campo contabilizado, traçando-se duas linhas perpendiculares, respeitando-se os limites das células e dos aneurismas encontrados. Desta forma, foram obtidos dois diâmetros, a partir dos quais se calculou o diâmetro médio de cada célula. O diâmetro médio desses parâmetros para os grupos controle e para cada concentração foi calculado a partir do somatório dos valores individuais da variável para cada animal.

Análises histopatológicas

As lâminas histológicas foram analisadas com o objetivo de se avaliar a estrutura do órgão, além de prováveis alterações induzidas pelo tóxico (Figura 2).

Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homocedasticidade (Cochran e Bartlett) e, posteriormente à análise de variância. Quando apresentaram significância, foi realizado o teste de Duncan ($P < 0,05$) para comparar as médias entre tratamentos. Quando não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos aos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (SAEG, 1999).

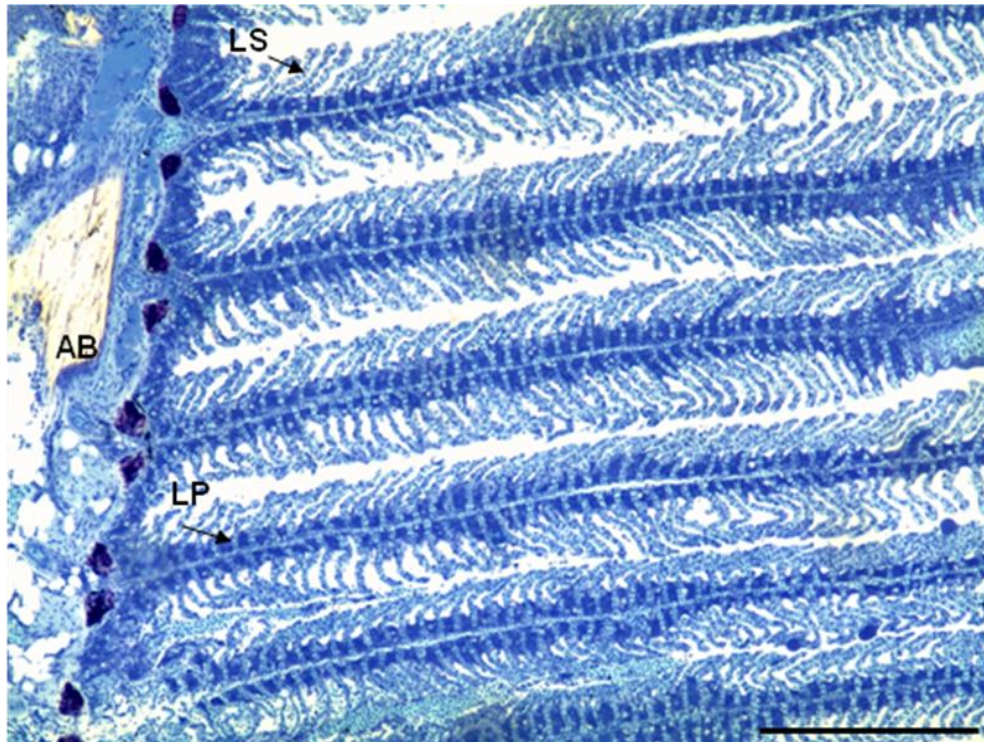


Figura 1. Corte longitudinal de brânquias de fêmea madura de *A. bimaculatus* mostrando morfologia normal. Arco branquial (AB), lamelas primárias (LP) e lamelas secundárias (LS). Azul de toluidina. Barra: 30µm.

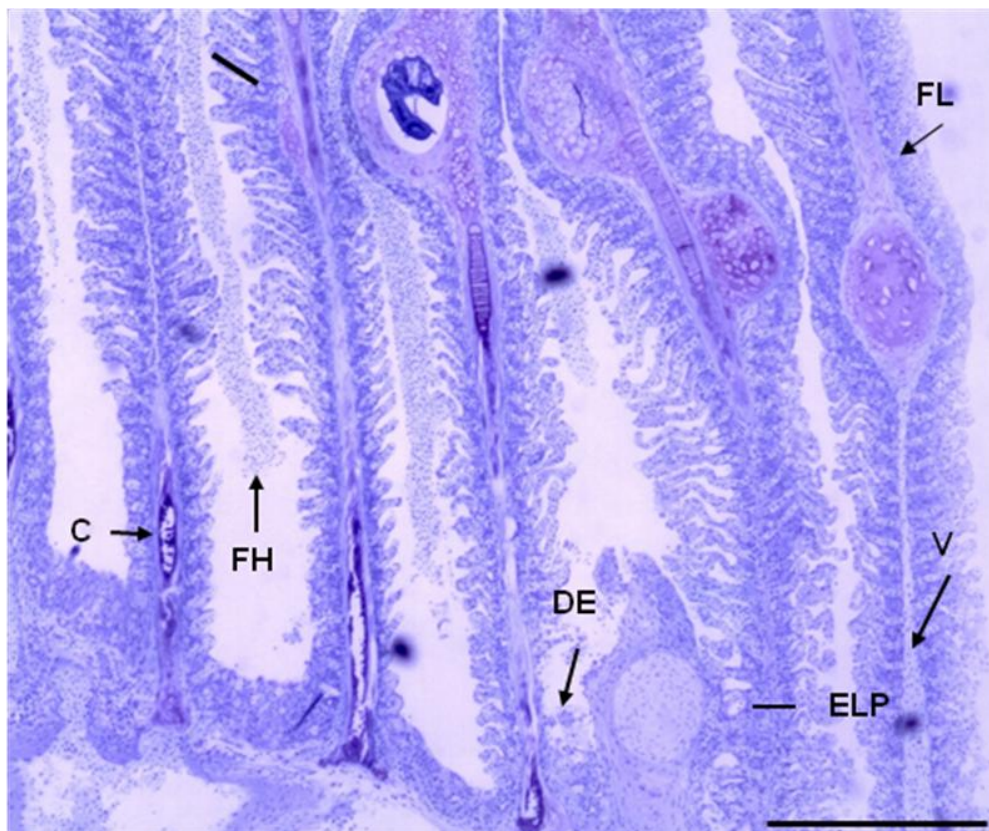


Figura 2. Corte longitudinal de brânquias de fêmea madura de *A. bimaculatus*. Cartilagem (C), comprimento de lamelas secundárias (—), destruição do epitélio (DE), espessura de lamelas primárias (ELP), foco de hemorragia (FH), fusão lamelar (FL), vasodilatação entre as lamelas primárias (V). Azul de toluidina. Barra 30µm.

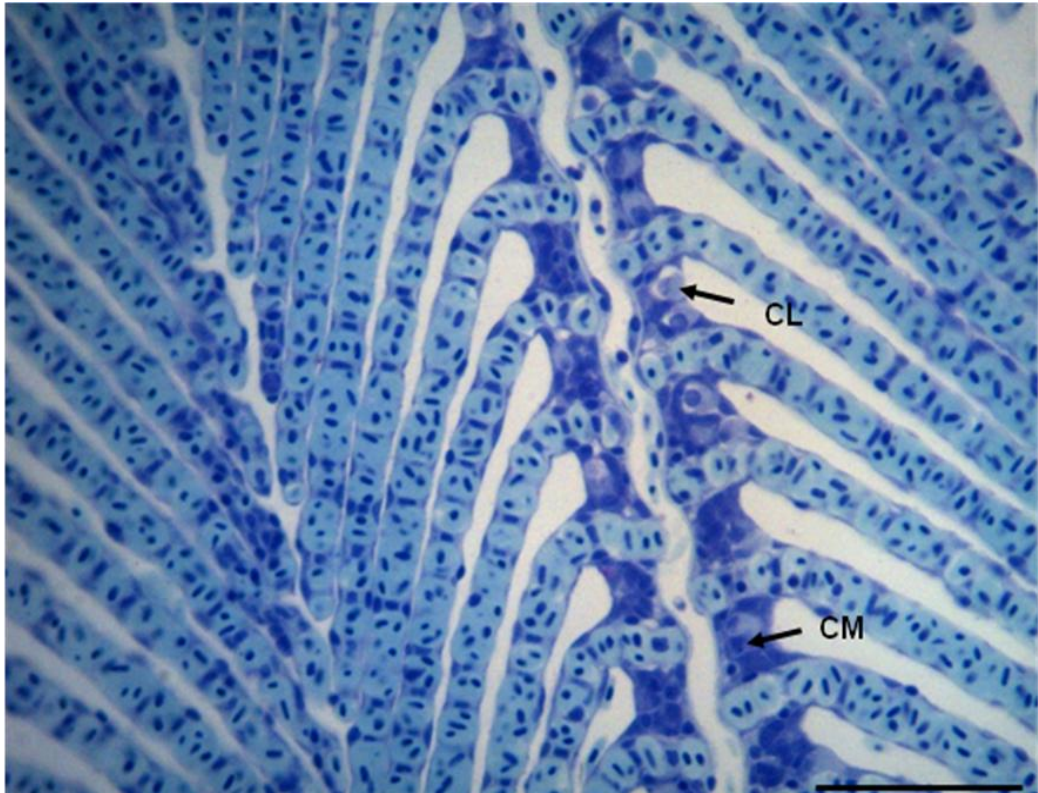


Figura 3. Corte longitudinal da brânquia de fêmea madura de *A. bimaculatus*. Célula de cloreto (CL); célula de muco (CM). Azul de toluidina. Barra 50µm.

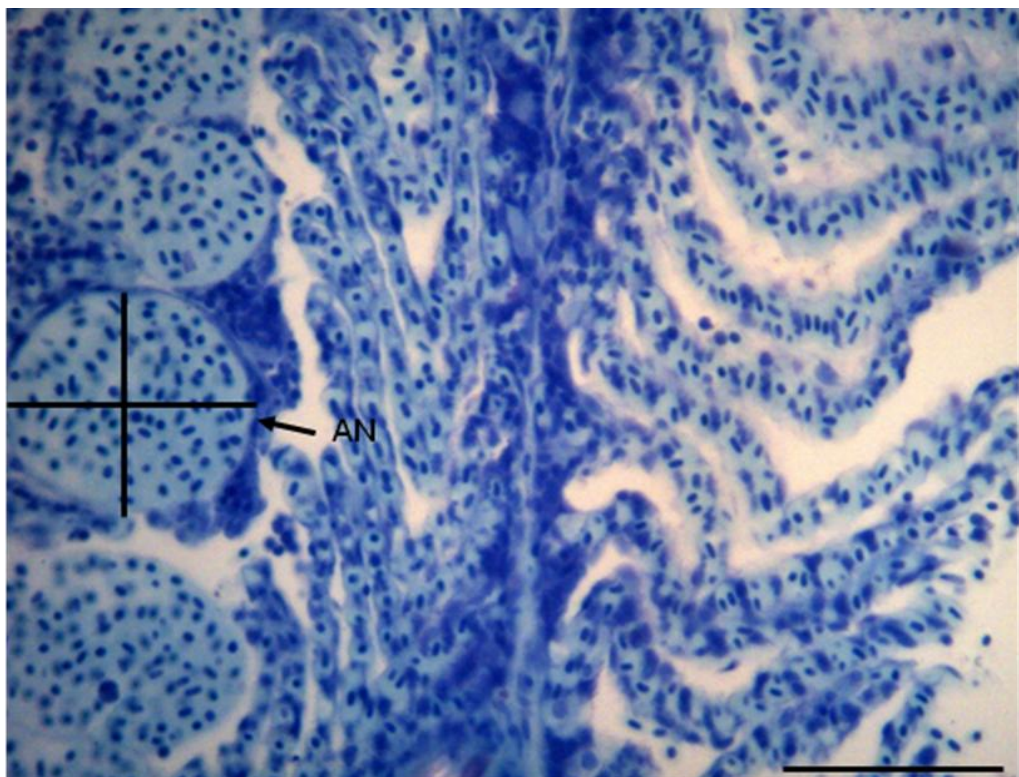


Figura 4. Corte longitudinal da brânquia de fêmea madura de *A. bimaculatus* representando a obtenção do diâmetro do aneurisma (AN). Azul de toluidina. Barra 50µm.

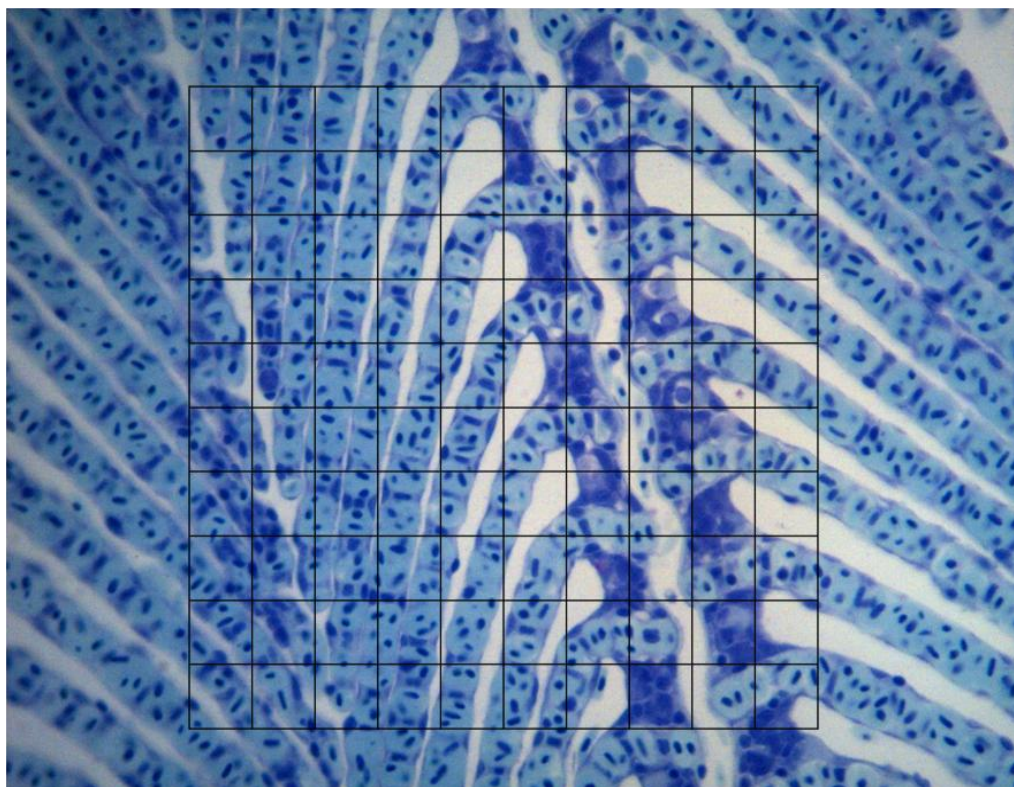


Figura 5. Corte longitudinal da brânquia de fêmea madura de *A. bimaculatus*, com superposição de retículo micrométrico com 1 mm². Quantificação de pontos sobre tecido brânquial. Azul toluidina. Barra 50μm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CL₅₀-96h

A definição das concentrações tóxicas foi testada a partir de uma análise preliminar, para a definição da melhor faixa de concentração a ser considerada nos testes definitivos. Informações obtidas por meio de testes já realizados com outros organismos que mais se assemelham filogeneticamente ao grupo em questão, concordando com Ranzani-Paiva (1997) e Silva Filho (2010), pois, a partir dos resultados obtidos nesta fase, foi possível estabelecer a faixa ideal de concentração para condução dos testes definitivos com as fêmeas de lambari do presente experimento.

As concentrações utilizadas mostraram que nas primeiras seis horas observou-se mortalidade de 100,0; 94,4; 73,3; 26,6 e 20,0% nas concentrações de 96, 48, 24, 12 e 6μg.L⁻¹ de Thiodan, respectivamente. Na concentração 3,0μg.L⁻¹ constatou-se a morte de um peixe no final das 96hs. As menores quantidades de mortalidade de peixes foram registradas nas concentrações de 3,0 e 6,0μg.L⁻¹ de

Thiodan[®] apresentando, respectivamente, 94,4% e 80% de sobrevivência. A concentração de 1,5µg.L⁻¹ de Thiodan[®] não provocou mortalidade.

O teste apresentou uniformidade nos resultados, com mortalidade crescente e suficiente para determinar a CL₅₀, além de contrariar qualquer possibilidade de uma resposta ou defesa fisiológica em doses baixas.

A remoção dos animais mortos ocorreu para se evitar interferências pela decomposição dos peixes, gerando maior confiança da mortalidade apresentada em função da toxicidade do princípio ativo endossulfan sinergicamente à ação dos solventes e demais compostos do inseticida.

O valor determinado para a CL_{50-96h} para fêmeas de *A. bimaculatus* em maturação avançada foi de 13,6µg.L⁻¹, com intervalo de confiança de 10,1 a 18,4µg.L⁻¹ (P<0,05).

O valor encontrado por Musanhi (1987) para adultos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) foi de 1,42 µg/L para CL_{50-96h}, enquanto em *Oreochromis mikiyss* Capkin et al. (2006) encontraram 1,75µg/L em 96 horas. Em fêmeas da espécie *Jenynsia multidentata*, a CL_{50-96h} foi de 1,317 µg/L (Ballesteros et. al, 2009). Montoya (2008) trabalhando com juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus*, encontrou o valor de CL₅₀ igual a 1,42µg.L⁻¹ para 96h.

Silva Filho (2010) observou em seus estudos sobre os efeitos do Thiodan[®] em machos adultos de *A. bimaculatus*, a CL₅₀ do Thiodan[®] de 17,7µg.L⁻¹ e o intervalo de confiança de 11,1µg.L⁻¹. Esses valores mostram que o lambari apesar de ser de pequeno porte, apresenta valores de resistência maiores que espécies de maior porte.

Os valores de temperatura da água variaram entre 22,0 e 24,5°C, com média de 23,3±0,72°C. A estabilidade térmica é importante, pois se sabe que a ação do tóxico varia de acordo com a temperatura (Correa et al., 2001), além desta interferir na concentração de oxigênio dissolvido, maior em temperaturas inferiores, e menor em temperaturas mais elevadas. Para Capkin (2006), algumas variáveis como a temperatura e a alcalinidade da água, bem como o menor tamanho dos espécimes aumentam a toxicidade do endossulfan nos peixes. Ware (2004) e Coutinho et al. (2005) explicam que o efeito dos ciclodienos é diretamente proporcional à temperatura da água, ou seja, quanto mais alta a temperatura, mais tóxicos se tornam.

Comportamento dos peixes expostos as concentrações subletais

Durante a exposição ao Thiodan[®] foi observado comportamento anormal dos peixes. Foi verificada a ocorrência de nados erráticos, tentativa de fuga dos aquários, demonstração de agressividade com os demais peixes e busca de oxigênio na superfície. Estas mudanças comportamentais ocorreram apesar de todas as concentrações do agrotóxico utilizadas (1,3, 2,6 e 5,2 µg/L⁻¹) serem inferiores à CL₅₀ (13,6 µg.L⁻¹) determinada para a espécie. Esse comportamento dos peixes foi devido à ação da toxicidade total do agrotóxico, e não apenas do princípio ativo do tóxico sobre o sistema nervoso. A transmissão de impulsos é mediada por neurotransmissores, alguns deles são excitatórios, outros inibitórios. O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um dos principais transmissores inibitórios no cérebro e medula espinhal. Autores como Dowson (1977) e Ware (2004) relatam o mecanismo inibidor do quimiorreceptor GABA, explicando que este mecanismo consiste em um estímulo inibidor que leva a uma hiperpolarização da membrana, bloqueando o excitatório. Ciclodienos ligam-se ao sítio de ligação dos receptores/canais GABA individuais, induzindo rápida mudança conformacional do canal para o estado dessensibilizado, suprimindo o fluxo de Cl⁻ para o interior da membrana (Bloomquist, 1996). Como consequência, há propagação contínua do impulso nervoso, que provoca convulsões, prostração, tremores e, posteriormente, a morte, o que pode ser observado em insetos, como também em qualquer espécie de peixe, crustáceo e mamífero, inclusive nas exposições de baixas concentrações (Eto, 1990; Pinheiro et al., 1998).

No experimento 1, observou-se que oito horas após seu início, na concentração de 5,2 µg/L⁻¹ houve comportamento anormal dos animais, respiração rápida e nado errático. Com 12 horas foi observado que 27 (90%) dos 30 animais deste grupo já haviam morrido devido à ação do Thiodan[®], apesar desta concentração ser considerada subletal.

No experimento 2, após quatro horas de seu início, foi observado comportamento anormal dos animais, como natação rápida, respiração acelerada e comportamento de fuga na maior concentração (5,2 µg/L⁻¹). Após sete horas observou-se nado errático, com os peixes batendo contra o vidro e não se alimentando, além de mortalidade nos três aquários dessa concentração. Após 24 horas, os animais demonstraram calma aparente, tendo sobrevivido 21 (70%) dos 30

animais iniciais. Os sobreviventes desta concentração aparentemente estavam normais e alimentando, enquanto que nas concentrações 1,3 e 2,6 $\mu\text{g/L}^{-1}$, os animais apresentavam normalidade de comportamento, sem mortalidade.

No experimento 3, na concentração de 5,2 $\mu\text{g/L}^{-1}$, ocorreu mortalidade de 18 (60%) dos 30 animais, doze horas após o início deste experimento. Durante todo este experimento, foi observado que os animais se mantiveram estressados. Nas demais concentrações (1,3 e 2,6 $\mu\text{g/L}^{-1}$), após 24 horas do início, os animais apresentavam comportamento normal e procuraram por alimento. Na concentração 2,6 $\mu\text{g/L}^{-1}$, houve morte de um (3%) animal.

No experimento 4, não houve mortalidade de animais na concentração 1,3 $\mu\text{g/L}^{-1}$; na concentração 2,6 $\mu\text{g/L}^{-1}$, houve mortalidade de oito peixes (27%), na concentração 5,2 $\mu\text{g/L}^{-1}$, houve mortalidade de 15 (50%) animais.

Mesmo tendo sido observada mortalidade dos peixes, em todos os experimentos, no experimento 1 ocorreu maior número de mortes, onde a temperatura da água apresentou média de 26,9°C, superior a dos demais experimentos. Por isso, sugere-se que a temperatura da água pode ter interferido na ação do tóxico. Segundo Correa et al. (2001), Ware (2004) e Coutinho et al. (2005) o efeito da ação do agente do tóxico varia de acordo com a temperatura da água, ou seja, quanto mais alta a temperatura, mais tóxicos se tornam.

Análise de água

Os parâmetros indicadores da qualidade da água utilizados para realização dos experimentos foram aferidos para garantir que possíveis alterações na água não acarretassem mortalidade ou aumento na toxicidade do produto sobre as brânquias.

A escolha do uso de água tratada para consumo humano mantida em caixa d'água de 1000L mostrou-se adequada, minimizou os risco de resíduos, contaminações cruzadas e demais interferências nos parâmetros aferidos. A manutenção da água nos aquários durante 10 dias antes da aclimação dos animais, e com aeração contínua, visou minimizar o estresse dos animais, controlar a temperatura, reduzir o cloro residual e estabilizar os demais parâmetros físico-químicos.

As tabelas 6 a 9 (Experimentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente) demonstram que os parâmetros mensurados encontram-se em conformidade com as condições de

cultivo e criação de peixes tropicais (Huet, 1983; Kubitza, 2000), como também de acordo com a Resolução nº 357 do CONAMA de 2005 (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros de qualidade da água com base nas recomendações do CONAMA nº 357/05, de acordo com a classe 2 que classifica águas destinadas à criação natural e/ou intensiva de organismos aquáticos ao consumo humano. Valores não contemplados pela resolução estão indicados com numeração a qual se refere a literatura específica sobre o assunto.

Parâmetros	Valor de referência
Alcalinidade total (mg /L CaCO_3)	>20 ⁽²⁾
DBO (mg/L)	≤ 5
Nitrato (mg/L)	≤10,0
Oxigênio dissolvido (mg/L)	>5,0
pH	6-9
Temperatura da água (°C)	28-32 ⁽¹⁾
Transparência da água (m)	0,40-0,60 ⁽¹⁾
Turbidez (NTU)	≤ 100

(1) KUBITZA (1999) (para os peixes de espécies tropicais)

(2) SIPAÚBA-TAVARES (1994)

Tabela 6. Valores de parâmetros físicoquímicos da água no experimento 1.

Análise	Início	Fim			
		Controle	Concentração 1.3 μgL^{-1}	Concentração 2.6 μgL^{-1}	Concentração 5.2 μgL^{-1}
pH	7,1	7,2	7,3	7,0	7,3
Cor aparente	0	0	0	0	5
Temperatura	26,8	26,8	27,1	26,9	26,9
Turbidez (UNT)	0,5	1,1	0,9	0,7	0,6
O_2 aq (mg.L^{-1})	6,7	5,9	5,9	6,0	6,2
DBO (mg.L^{-1})	<2	<2	<2	<2	5
Cloro (Cl_2) (mg.L^{-1})	0	0	0	0	0
Cloreto (Cl^{-1}) (mg.L^{-1})	3,4	2,2	3,3	3,7	4,8
Cloreto (NaCl)	5,7	1,3	2,0	2,2	2,9
Nitrato (NO_3^-) (mg.L^{-1})	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Dureza Total (CaCO_3/L mg.L^{-1})	18,9	26,8	23,5	26,8	23,5

Tabela 7. Valores de parâmetros físicoquímicos da água no experimento 2.

Análise	Início	Fim			
		Controle	Concentração 1.3 µg.L ⁻¹	Concentração 2.6 µg.L ⁻¹	Concentração 5.2 µg.L ⁻¹
pH	7,0	6,95	6,75	6,79	6,95
Cor aparente	0	0	5	5	5
Temperatura	25,4	25,4	25,6	25,5	25,4
Turbidez (UNT)	0,51	6,6	2,4	1,3	2,2
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	6,6	6,0	6,4	6,8	6,8
DBO (mg.L ⁻¹)	5	4	5	4	7
Cloro (Cl ₂) (mg.L ⁻¹)	0	0	0	0	0
Cloreto (Cl ⁻¹) (mg.L ⁻¹)	3,4	3,3	3,6	3,1	3,1
Cloreto (NaCl) (mg.L ⁻¹)	5,6	5,5	5,9	5,2	5,1
Nitrato (NO ₃) (mg.L ⁻¹)	0,2	0,6	0,6	0,5	0,6
Dureza Total (CaCO ₃ /L mg.L ⁻¹)	17,8	25,9	27,8	27,4	26,4

Tabela 8. Valores de parâmetros físicoquímicos da água no experimento 3.

Análise	Início	Fim			
		Controle	Concentração 1.3 µg.L ⁻¹	Concentração 2.6 µg.L ⁻¹	Concentração 5.2 µg.L ⁻¹
pH	7,2	7,1	7,5	7,1	7,4
Cor aparente	5	0	0	5	5
Temperatura	24,8	24,8	24,7	24,4	24,4
Turbidez (UNT)	1,9	1,9	2,9	1,9	2,2
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	7,2	6,7	6,4	6,8	7,2
DBO (mg.L ⁻¹)	2	4	5	3	3
Cloro (Cl ₂) (mg.L ⁻¹)	0	0	0	0	0
Cloreto (Cl ⁻¹) (mg.L ⁻¹)	3,1	4,5	5,2	6,3	3,6
Cloreto (NaCl) (mg.L ⁻¹)	5,2	7,4	8,7	10,4	5,9
Nitrato (NO ₃) (mg.L ⁻¹)	1,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Dureza Total (CaCO ₃ /L mg.L ⁻¹)	34,6	31,7	34,5	35,5	40,3

Tabela 9. Valores de parâmetros físicoquímicos da água no experimento 4.

Análise	Início	Fim			
		Controle	Concentração 1.3 µg.L ⁻¹	Concentração 2.6 µg.L ⁻¹	Concentração 5.2 µg.L ⁻¹
pH	7,1	6,7	7,3	7,3	7,2
Cor aparente	5	5	10	10	10
Temperatura	25,0	25,0	24,5	24,7	24,7
Turbidez (UNT)	1,3	1,3	2	1,3	2,4
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	7,5	6,3	6,8	7,0	7,2
DBO (mg.L ⁻¹)	<2	4	5	5	6
Cloro (Cl ₂) (mg.L ⁻¹)	0	0	0	0	0
Cloreto (Cl ⁻¹) (mg.L ⁻¹)	1,1	2,7	2,7	2,9	3,3
Cloreto (NaCl) (mg.L ⁻¹)	1,8	4,4	4,4	4,8	5,5
Nitrato (NO ₃) (mg.L ⁻¹)	0,1	0	0,1	0,1	0,1
Dureza Total (CaCO ₃ /L mg.L ⁻¹)	26,9	21,1	26,9	30,7	36,5

Os valores de OD (oxigênio dissolvido) permaneceram altos do início ao fim dos experimentos, e os valores de DBO (demanda bioquímica de oxigênio)

apresentam alterações acima do limite de detecção ($2,0\text{mg.L}^{-1}$) do método (Eaton et al., 2005). Os resultados demonstraram que o oxigênio disponível para os peixes ao longo dos experimentos foram satisfatórios. O resultado de OD mostrou que o comportamento dos peixes em busca de oxigênio na superfície do aquário se deve à ação tóxica do produto sobre os animais.

Nos experimentos 2 (Tabela 7) e 4 (Tabela 9), a DBO teve seu nível aumentado comparado com o início do experimento. O motivo do aumento da DBO na água desses aquários foi devido a vários fatores como alimentação, excreção de urina, fezes, escamas, *stress* e a ocorrência de mortalidades nas maiores concentrações, acarretando mais matéria orgânica para a água dos aquários, proporcionando, assim, maior competição de oxigênio num ambiente fechado.

Dessa forma, mesmo os níveis da DBO estando acima do estabelecido pela Resolução CONAMA 357/2005, (Classe 2), esses valores não comprometem a vida dos peixes num ambiente natural ou em aquário, devido ao nível do oxigênio estar acima do nível da DBO na água. Porém, no experimento 2, o nível de DBO esteve maior do que o do oxigênio dissolvido (OD); mesmo assim, a mortalidade de peixes no experimento 2 foi menor do que no experimento 1 onde oxigênio dissolvido foi maior. Essa mortalidade ocorreu ao longo de 24 horas após os peixes serem expostos ao agente tóxico, foi observado comportamento típico de peixes contaminados por organoclorados, a hiperexcitação. Essa situação foi comprovada em observação comparada com os grupos controles onde os peixes não tiveram anormalidade comportamental e não houve mortalidade, mesmo apresentando níveis elevados de DBO na água nos aquários controles. Portanto, sugere-se que a mortalidade não foi causada pela DBO, mas pela ação do tóxico.

Os níveis de nitrato mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005. A baixa quantidade de nitrato registrada no presente experimento foi causada pelo não acúmulo exagerado de matéria orgânica, e excretas nitrogenadas nos peixes dos aquários. No entanto, não houve proliferação de bactérias nitrificantes aeróbicas, que atuariam na degradação sobre as substâncias nitrogenadas, elevando os níveis de nitritos e nitratos na água.

Por mais que se tenha aumentado o nível de matéria orgânica na água, os níveis de oxigênio nos experimentos 2 e 4 permaneceram dentro dos limites determinados pela Resolução do CONAMA 357/2005, que estabelece padrões para

corpos de água onde haja pesca ou cultivo de organismo para fins de consumo intensivo, garantindo a respiração normal dos peixes.

A temperatura (Tabela 10) ficou na faixa desejada para o cultivo e criação de peixes tropicais, que varia de 24,0 a 28,0°C (Huet, 1983; Kubitza, 2000; Montoya, 2008; Silva Filho, 2010), o que garantiu o estudo do agrotóxico em condições ideais neste parâmetro.

Tabela 10. Valores médios das temperaturas durante a realização dos diferentes experimentos.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	26,8±1,05	25,4±0,49	24,8±0,69	25,0±0,49
1,3µg.L ⁻¹	27,1±1,04	25,6±0,59	24,7±0,45	24,5±0,40
2,6µg.L ⁻¹	26,9±1,17	25,5±0,48	24,4±0,62	24,7±0,43
5,2µg.L ⁻¹	26,9±1,18	25,4±0,48	24,4±0,63	24,7±0,38

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Dados biométricos

De acordo com as Normas da ABNT (2006), para se avaliar a toxicidade de uma substância, os lotes de organismos devem ser homogêneos e não apresentar mal-formações. Para verificar a homogeneidade dos lotes foi conduzida uma comparação entre e nos experimentos em diferentes concentrações do peso corporal, comprimento padrão e comprimento total dos peixes submetidos ao bioensaio. A verificação ocorreu após o bioensaio para se evitar estresse nos peixes. Segundo Zagatto e Bertolletti (2008), todos os organismos utilizados em um determinado ensaio devem ter aproximadamente a mesma idade e devem ser provenientes de uma mesma cultura, o que foi característica do presente estudo.

O lote utilizado no experimento 4 foi o que apresentou menor homogeneidade dos valores médios de comprimento padrão, comprimento total e peso corporal quando comparado o grupo controle com aquele de concentração 5,2µg.L⁻¹ (Tabelas 2, 3 e 4).

Entre os experimentos 1 e 4 houve diferença estatística no grupo controle ($P < 0,05$) em relação ao comprimento total. Com exceção do experimento 4, que apresentou menor homogeneidade, não houve diferença significativa nos valores dos parâmetros biométricos nem dentro nem entre experimentos. Com isso, evitou-se que a ação do tóxico (Thiodan[®]) interferisse de maneira diferenciada nos animais.

Análises morfológicas

Análises histopatológicas

As análises histológicas de brânquias dos organismos expostos às amostras ao Thiodan® (endosulfan) nas diferentes condições experimentais, em diferentes concentrações, apresentaram alterações em relação aos organismos mantidos no grupo controle, como hiperplasia, fusão lamelar, destruição e/ou descolamento do epitélio lamelar (Figura 6). Isso se justifica porque, uma vez que os organismos foram expostos a concentrações subletais de poluentes, a mortalidade de grande número de organismos não era esperada. No entanto, essas concentrações poderiam resultar em distúrbios fisiológicos, histológicos e/ou comportamentais a longo prazo concordando com observado por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994).

Segundo Pawert et al. (1998) os organismos aquáticos têm capacidade de tolerar e compensar condições de estresse subletal quando expostos a agrotóxicos, pois desenvolvem alterações morfológicas, que por vezes comprometem, por longo período, sua sobrevivência (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Pawert et al., 1998) e, quando analisados, demonstram os efeitos do stress por eles sofridos (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Adams et al., 2000). Algumas alterações morfológicas podem ser identificadas em análises histológicas.

Schwaiger et al. (1997) chamam a atenção para a importância de uma comparação entre organismos submetidos às condições de controle e aqueles expostos às amostras ambientais, o que possibilita evitar possíveis erros de interpretação dos resultados obtidos, pois as condições de controle são usadas como referências nas análises posteriores.

Sendo assim, as brânquias tornam-se sensíveis a ação de poluentes, pelo seu permanente contato com o ambiente aquático por meio de amplas superfícies de trocas (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Triebkorn et al., 2002), que por sua vez podem comprometer o desenvolvimento de suas formas vitais.

Karlsson-Norrgren et al. (1985) e Erkmen e Kolankaya (2000) afirmam que algumas alterações atuam como mecanismos de defesa do órgão como respostas a vários tipos de agentes tóxicos que podem comprometer a função branquial.

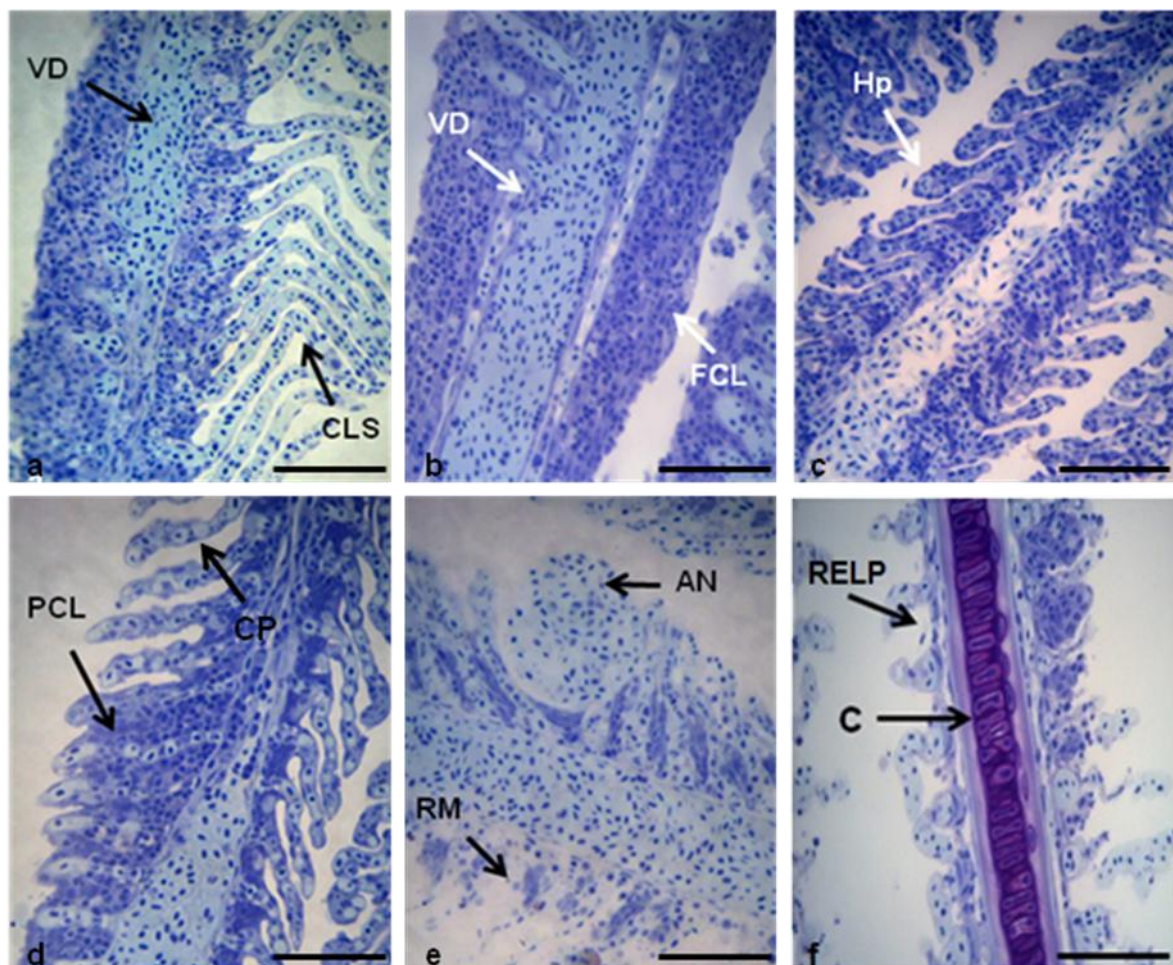


Figura 6: Alterações histológicas nas brânquias de fêmeas maduras de lambaris *A. bimaculatus* expostas ao Thiodan: a) vasodilatação (VD) do terço apical, proliferação do comprimento da lamela secundária (CLS); b) fusão completa das lamelas secundárias (FCL), vasodilatação (VD); c) hiperplasia nas lamelas secundárias (Hp); d) célula pilar (CP), proliferação celular (PCL) entre as lamelas secundárias; e) aneurisma (AN), ruptura de membrana (RM) das lamelas secundárias; f) Redução do epitélio lamelar primário (RELPE). Observe ainda a presença característica da cartilagem (C) branquial. Azul de toluidina. Barra 20µm.

Mallat (1985), Winkaler et al. (2001) e Fontainhas-Fernandes et al. (2008) observaram alterações em brânquias de peixes expostas a substâncias tóxicas como elevação epitelial, necrose, hipertrofia, hiperplasia e fusão de lamelas, ruptura do tecido branquial, hipersecreção e proliferação de células mucosas.

Estudos realizados por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) propuseram uma classificação para as lesões branquiais compostas por três estádios progressivos com base na capacidade do organismo recuperar suas funções normais após determinado período de melhora das condições ambientais. O primeiro estádio inclui lesões que podem ser reversíveis caso haja melhora nas condições ambientais às quais os organismos estão expostos. No entanto, caso as condições insatisfatórias permaneçam podem ser tornar lesões de segundo estádio. Estas são caracterizadas

por alterações mais graves e difíceis de serem revertidas caso haja melhora ou, havendo a exposição crônica, podem atingir o terceiro estágio, no qual a recuperação da estrutura branquial não é possível, e o organismo tem sua sobrevivência ameaçada, uma vez que as funções vitais das brânquias foram comprometidas.

Análises morfométricas

Sistema vascular

A análise da morfologia do sistema vascular das brânquias está apresentada nas tabelas 11, 12 e 13. Nesta análise foram comparadas as observações obtidas dos indivíduos mantidos como controle com aqueles expostos às concentrações previamente definidas (1,3, 2,6 e 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$) comparando-se os valores médios encontrados entre eles.

Analisando a base das lamelas primárias (Tabela 11) nos quatro experimentos não foram observadas diferenças ($P>0,05$) em nenhuma das concentrações (1,3, 2,6 e 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$) do Thiodan[®] dentro dos experimentos. No entanto, quando comparados os experimentos 1 e 3 nas concentrações 1,3 e 2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$).

Quanto à análise do terço médio das mesmas lamelas primárias (Tabela 12) não foram verificadas alterações nem entre os experimentos e nem dentro dos mesmos. Porém, na análise do ápice das lamelas (Tabela 13) no experimento 1, houve diferença estatística entre os grupos, observada somente entre as concentrações 1,3 e 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Tabela 11. Espessura (μm) do sistema vascular na base das lamelas primárias das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	49,37 \pm 5,66 ^{Aa}	47,80 \pm 17,83 ^{Aa}	43,12 \pm 20,16 ^{Aa}	49,07 \pm 19,50 ^{Aa}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	70,77 \pm 16,17 ^{Aa}	43,02 \pm 24,26 ^{Aab}	32,81 \pm 22,29 ^{Ab}	50,19 \pm 27,39 ^{Aab}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	55,37 \pm 23,53 ^{Aa}	32,68 \pm 17,19 ^{Aab}	30,81 \pm 12,97 ^{Ab}	47,42 \pm 27,31 ^{Aab}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	46,46 \pm 20,64 ^{Aa}	32,83 \pm 22,19 ^{Aa}	23,61 \pm 16,36 ^{Aa}	41,02 \pm 23,46 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

Tabela 12. Espessura (μm) do sistema vascular no terço médio das lamelas primárias das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	48,30 \pm 17,36 ^{Aa}	51,17 \pm 27,06 ^{Aa}	37,46 \pm 18,19 ^{Aa}	45,24 \pm 19,53 ^{Aa}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	54,20 \pm 18,46 ^{Aa}	45,33 \pm 22,69 ^{Aa}	35,78 \pm 25,76 ^{Aa}	46,75 \pm 28,70 ^{Aa}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	54,36 \pm 21,48 ^{Aa}	48,11 \pm 17,93 ^{Aa}	54,33 \pm 11,72 ^{Aa}	59,35 \pm 20,76 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	57,32 \pm 16,94 ^{Aa}	40,10 \pm 19,37 ^{Aa}	47,05 \pm 18,41 ^{Aa}	50,86 \pm 20,56 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

Tabela 13. Espessura (μm) do parâmetro sistema vascular no ápice das lamelas primárias (em μm) das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	66,27 \pm 19,43 ^{Ba}	54,47 \pm 12,31 ^{Aab}	56,73 \pm 15,41 ^{Aab}	46,95 \pm 12,97 ^{Ab}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	72,22 \pm 19,30 ^{ABa}	59,01 \pm 15,96 ^{Aa}	59,49 \pm 27,79 ^{Aa}	55,08 \pm 25,36 ^{Aa}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	57,57 \pm 16,06 ^{Ba}	56,30 \pm 15,96 ^{Aa}	52,43 \pm 10,50 ^{Aa}	59,32 \pm 17,13 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	50,21 \pm 14,07 ^{BCa}	52,17 \pm 14,84 ^{Aa}	47,88 \pm 10,92 ^{Aa}	55,25 \pm 12,30 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

As alterações encontradas nos organismos expostos ao Thiodan® foram caracterizadas por lesões de grau primário de acordo com a classificação de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994). Apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas além das mencionadas anteriormente, os maiores valores para espessura do sistema vascular foram registrados para o experimento 1. Talvez essas alterações sejam em função dos animais não terem passado por adaptação e nem terem recebido alimento, poderia indicar estresse com relação à adaptação ao novo ambiente. Esse aspecto também pode ter relação com a maior temperatura da água desses aquários (26,8°C) quando comparado aos experimentos 2, 3 e 4 (25,4°C, 24,8°C e 25,0°C, respectivamente). Segundo Kubtiza (1997), quanto maior a temperatura da água, menor a disponibilidade de oxigênio, e o animal poderia compensar com o aumento da espessura do vaso sanguíneo.

Espessura das lamelas primárias

Os dados obtidos nas mensurações de espessura das lamelas primárias das brânquias dos animais nos diferentes experimentos são apresentados nas tabelas 14, 15 e 16.

Os valores obtidos para a espessura da base das lamelas primárias mostraram que não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) em nenhum dos experimentos e nem entre eles (Tabela 14).

No terço médio da brânquia, quando foram comparadas as concentrações dentro do experimento 3, foi observada diferença ($P<0,05$) entre o grupo controle e o grupo com concentração $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$. Porém, quando se realizou comparação entre os experimentos, diferença foi observada entre os grupos controle dos experimentos 1 e 3 e, na concentração $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$ nos experimentos 3 e 4 ($P<0,05$) (Tabela 15). Apesar de não serem observadas diferenças entre as concentrações (1,3, 2,6 e $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$) dentro dos experimentos e entre eles, houve uma tendência à diminuição na espessura das lamelas primárias da menor para a maior concentração, o que segundo Temmink et al. (1983) pode ser devido a alterações morfológicas como descamação do epitélio filamentar, necrose e ruptura das células epiteliais que geralmente resultam de uma resposta aguda e direta do agrotóxico no epitélio branquial.

Resultados semelhantes foram descritos por Monteiro (2009), ao estudar os efeitos do cobre nas brânquias de tilápias nilóticas. Além dessas alterações mencionadas, observou-se a fusão das lamelas secundárias, considerada alteração de segundo estágio. Segundo Rodrigues (2007), ao avaliar impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidade), também foi observada fusão lamelar.

Apesar de não haver diferença estatística entre experimentos e entre as concentrações ($P>0,05$) para as espessuras do epitélio lamelar no terço apical, os valores diminuíram do controle para a maior concentração (Tabela 16).

Tabela 14. Espessura total (μm) do epitélio lamelar das lamelas primárias no terço basal das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	83,26±29,43 ^{Aa}	101,34±37,02 ^{Aa}	87,71±16,98 ^{Aa}	77,03±19,89 ^{Aa}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	100,51±47,62 ^{Aa}	83,62±34,41 ^{Aa}	68,81±23,93 ^{Aa}	87,36±26,64 ^{Aa}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	100,10±46,56 ^{Aa}	103,58±33,57 ^{Aa}	79,33±22,68 ^{Aa}	78,65±39,15 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	79,42±31,26 ^{Aa}	73,47±22,16 ^{Aa}	68,65±19,92 ^{Aa}	72,08±21,31 ^{Aa}

Valores expressos como média±desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

Tabela 15. Espessura total (μm) do epitélio lamelar das lamelas primárias no terço médio das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	100,10 \pm 25,37 ^{Ab}	115,57 \pm 36,19 ^{Aab}	131,57 \pm 25,29 ^{Aa}	102,05 \pm 15,75 ^{Aab}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	116,99 \pm 32,94 ^{Aa}	112,90 \pm 26,33 ^{Aa}	99,81 \pm 29,96 ^{ABa}	96,07 \pm 39,72 ^{Aa}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	115,06 \pm 33,00 ^{Aa}	121,60 \pm 39,82 ^{Aa}	116,51 \pm 43,07 ^{Abba}	124,51 \pm 51,70 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	99,43 \pm 37,13 ^{Aab}	105,99 \pm 26,32 ^{Aab}	94,00 \pm 22,59 ^{Bb}	129,81 \pm 38,22 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

Tabela 16. Espessura total (μm) do epitélio lamelar das lamelas primárias no terço apical das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	133,07 \pm 44,44 ^{Aa}	143,64 \pm 53,77 ^{Aa}	146,10 \pm 37,99 ^{Aa}	117,91 \pm 24,04 ^{Aa}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	133,86 \pm 34,87 ^{Aa}	156,77 \pm 37,49 ^{Aa}	122,13 \pm 53,56 ^{Aa}	114,59 \pm 49,20 ^{Aa}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	138,01 \pm 28,71 ^{Aa}	142,88 \pm 24,07 ^{Aa}	166,23 \pm 60,62 ^{Aa}	153,49 \pm 44,36 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	102,76 \pm 25,50 ^{Aa}	127,80 \pm 34,25 ^{Aa}	123,92 \pm 23,63 ^{Aa}	147,87 \pm 35,69 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

Quantificação de focos de hemorragia e diâmetro de aneurismas

Não se observou diferença ($P>0,05$) dentro dos experimentos e nem entre eles nos diferentes grupos (controle, 1,3, 2,6, 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$) quando se analisou focos de hemorragia (Tabela 17).

Tabela 17. Quantificação de foco de hemorragia entre as lamelas primárias das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	0,37 \pm 0,71 ^{Aa}	0,79 \pm 1,81 ^{Aa}	0,33 \pm 1,12 ^{Aa}	0,12 \pm 0,61 ^{Aa}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,37 \pm 1,05 ^{Aa}	0,16 \pm 0,48 ^{Aa}	0,20 \pm 0,67 ^{Aa}	0,37 \pm 1,46 ^{Aa}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,54 \pm 1,14 ^{Aa}	0,45 \pm 2,04 ^{Aa}	0,37 \pm 1,17 ^{Aa}	0,33 \pm 1,09 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,25 \pm 0,86 ^{Aa}	0,20 \pm 0,50 ^{Aa}	0,37 \pm 0,87 ^{Aa}	0,75 \pm 1,87 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

A partir das medições dos diâmetros de dez aneurismas por experimento (Tabela 18), observou-se diferença estatística ($P<0,05$) quando comparados os experimentos 1 com 2 e com 3, havendo diminuição do diâmetro do aneurisma. Porém, quando comparados os experimentos 2 e 3 com o 4, observou-se aumento no diâmetro do aneurisma. Provavelmente, essas diferenças verificadas entre os experimentos se devem a fatores como estresse e/ou contato dos animais com o agrotóxico.

Tabela 18. Diâmetros (μm) de aneurismas nas brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*

Diâmetro	n	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Aneurismas	10	53,07 \pm 13,96 ^a	31,95 \pm 14,69 ^o	31,40 \pm 7,53 ^b	48,72 \pm 16,27 ^a

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$) entre experimentos. Teste de DUNCAN.

Segundo Garcia-Santos (2007), normalmente, ocorre o aneurisma, quando um ou dois eritrócitos são reunidos no lúmen de capilares que são delimitados por células pilares (Figura 6d). As células pilares são grupos de celulares que estão apoiadas sobre uma lâmina basal do epitélio respiratório. O arranjo dessas células permite a formação de canais por onde circula o sangue. Mecanismos de defesa do peixe frente a ação de tóxicos levam a respostas secundárias como elevação do epitélio e edema, que causam diminuição da área de superfície vulnerável da brânquia, e aumento da barreira de difusão ao poluente. Esses mecanismos diminuem o contato do tóxico com as lamelas branquiais, mas também levam a uma diminuição da eficiência de trocas gasosas, causando dificuldade respiratória e vasodilatação compensatória. Além disso, os capilares lamelares extremamente dilatados podem ficar frágeis e se romperem, levando ao aparecimento de focos de hemorragia entre as lamelas das brânquias.

Arellano et al. (2004) estudando as mudanças histológicas ocasionadas pela acumulação de cobre nas brânquias do linguado (*Solea senegalensis*), também observou ruptura de capilares lamelares com posterior extravasamento de eritrócitos. Estudos desenvolvidos por Mallatt (1985), Figueiredo-Fernandes et al. (2007) e Garcia-Santos et al. (2007) mostram que os aneurismas são resultados de anomalias circulatórias provavelmente causadas pelo efeito de metais pesados e pesticidas orgânicos como o endossulfan (Mallatt, 1985) nas brânquias dos animais.

De acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundizic (1994), as lesões brânquias foram classificadas em três estádios, sendo que os aneurismas estão classificados como estágio 2. No entanto, mais recentemente, Cerqueira e Fernandes (2002), reformularam os critérios de Poleksic e Mitrovic-Tutundizic, classificando as lesões branquiais em quatro grupos (G1, G2, G3 e G4), indicando os aneurismas no grupo 3 (alterações dos vasos sanguíneos), do ponto de vista da gravidade da lesão para o animal.

No presente experimento, o maior diâmetro dos aneurismas ocorreu no experimento 1, onde também se observou uma maior vascularização. As alterações podem ser devido ao aumento da temperatura da água.

Comprimento das lamelas secundárias

A análise do comprimento das lamelas secundárias nos terços basal e médio (Tabelas 19 e 20) mostrou que nos experimentos 1 e 2 não houve diferenças ($P>0,05$), quando comparado o grupo controle com os de concentrações 1,3, 2,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. No entanto, no experimento 1, verificou-se diminuição do comprimento das lamelas secundárias do terço basal, na concentração 5,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto que no experimento 2, na mesma concentração verificou-se um aumento das lamelas secundárias. Já nos experimentos 3 e 4 nenhuma alteração foi encontrada.

Analisando o terço apical (Tabela 21) dentro dos experimentos observou-se diferença ($P<0,05$) somente no experimento 1, ao comparar os grupos controle, 1,3 e 2,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ com a maior concentração 5,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Porém, quando comparando as concentrações 1,3 e 5,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, verificou-se diferença ($P<0,05$) do experimento 1 para os demais.

Tabela 19. Comprimento (μm) das lamelas secundárias no terço basal (em μm) das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	130,07 \pm 55,21 ^{Aa}	72,17 \pm 52,00 ^{Bb}	88,90 \pm 34,82 ^{Ab}	83,60 \pm 35,83 ^{Ab}
1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	101,46 \pm 65,69 ^{Aa}	71,38 \pm 37,96 ^{Bab}	89,66 \pm 33,86 ^{Aa}	107,01 \pm 38,63 ^{Aac}
2,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	114,36 \pm 63,61 ^{Aa}	65,92 \pm 40,89 ^{Bb}	91,48 \pm 33,05 ^{Aab}	79,70 \pm 46,60 ^{Aab}
5,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	32,47 \pm 43,68 ^{Bb}	101,87 \pm 22,18 ^{Aa}	85,51 \pm 25,06 ^{Aa}	97,48 \pm 25,19 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

Teste não-paramétrico de Kruskal Wallis (Saeg, 1999).

Tabela 20. Comprimento das lamelas secundárias no terço médio (em μm) das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	152,53 \pm 61,84 ^{Aa}	121,57 \pm 43,51 ^{Aa}	127,65 \pm 38,35 ^{Aa}	116,36 \pm 31,54 ^{Aa}
1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	140,17 \pm 53,53 ^{Aa}	133,40 \pm 43,26 ^{Aa}	128,95 \pm 45,88 ^{Aa}	137,28 \pm 49,97 ^{Aa}
2,6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	134,11 \pm 50,11 ^A	129,60 \pm 36,19 ^{Aa}	122,16 \pm 35,91 ^{Aa}	133,17 \pm 52,39 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	61,86 \pm 67,34 ^{Bb}	125,34 \pm 27,52 ^{Aa}	127,58 \pm 40,61 ^{Aa}	132,98 \pm 49,36 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P<0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P<0,05$).

Tabela 21. Comprimento das lamelas secundárias no terço apical (em μm) das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	157,14 \pm 59,81 ^{Aa}	141,68 \pm 43,78 ^{Aa}	125,21 \pm 71,02 ^{Aa}	123,89 \pm 41,71 ^{Aa}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	169,70 \pm 54,64 ^{Aa}	131,77 \pm 35,58 ^{Ab}	113,00 \pm 56,95 ^{Ab}	136,29 \pm 50,76 ^{Aab}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	145,17 \pm 41,30 ^{Aa}	119,24 \pm 34,72 ^{Aa}	130,00 \pm 32,83 ^{Aa}	130,86 \pm 57,57 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	63,67 \pm 80,54 ^{Bb}	145,63 \pm 32,15 ^{Aa}	137,52 \pm 47,85 ^{Aa}	136,10 \pm 40,60 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$).

No presente estudo, as alterações mais significativas dos valores médios encontradas nas três regiões (base, terço médio e ápice) foi no experimento 1, quando verificou-se que a temperatura da água foi mais elevada em relação aos demais experimentos (Tabela 10), fato este que pode ter interferido na atuação do agrotóxico, levando a variações do comprimento das lamelas secundárias das brânquias dos animais.

Segundo Capkin et al. (2006), a temperatura da água, pode afetar os organismos aquáticos quando expostos ao endossulfan. Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) explicam que a diminuição das lamelas secundárias pode levar à fusão de todas elas, classificando-as como estágio I e II.

Proporção de tecido branquial

No experimento 1, houve diferença ($P < 0,05$) entre a concentração 2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com as demais (controle, 1,3 e 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Já no experimento 3, observou-se diminuição dos pontos coincidentes com o tecido branquial na concentração 1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ quando comparado com o 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Entre os experimentos a maior diferença estatística ($P < 0,05$) foi observada na concentração 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no experimento 4 (Tabela 22).

Tabela 22. Proporção de tecido branquial em fêmeas de *A. bimaculatus* em cada grupo experimental.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	96,61 \pm 9,12 ^{Bb}	104,25 \pm 8,63 ^{Aab}	107,61 \pm 7,82 ^{Aa}	100,66 \pm 5,77 ^{Aab}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	99,05 \pm 9,07 ^{Ba}	106,47 \pm 7,48 ^{Aab}	99,86 \pm 99,86 ^{ABab}	97,91 \pm 10,99 ^{Aac}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	106,61 \pm 8,98 ^{Aa}	104,63 \pm 10,32 ^{Aa}	103,91 \pm 11,50 ^{Aa}	105,36 \pm 8,70 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	48,27 \pm 49,29 ^{Bcb}	107,91 \pm 9,83 ^{Aa}	108,13 \pm 6,67 ^{Aac}	103,00 \pm 8,55 ^{Aa}

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$).

O maior número de pontos coincidentes com tecido branquial pode ocorrer devido ao espessamento da lamela primária ou dilatação do sistema vascular das brânquias. Conseqüentemente, como um mecanismo de defesa frente à agressão pelo tóxico, sendo que o aumento da espessura do epitélio indica uma barreira ao Thiodan®.

No presente trabalho houve aumento dos pontos coincidentes com o tecido branquial o que sugere que as alterações verificadas ocorreram devido ao mecanismo de defesa dos animais quando expostos ao tóxico que foram denominadas por Karlsson-Norrgren et al. (1985) e Erkmen e Kolankaya (2000) como alterações “inespecíficas”. Esses autores também sugerem que essas alterações atuam como mecanismo de defesa dos peixes frente ao tóxico.

Diante disso, Santos (2009) ressalta que as alterações histopatológicas (hiperplasia interlamelar e conseqüente fusão de lamelas, edema subepitelial, elevação epitelial), embora sejam mecanismos de defesa, provocam o aumento da distância entre as células epiteliais e os capilares sanguíneos prejudicando, dessa forma, as trocas gasosas, gerando distúrbios de osmorregulação que comprometem a sobrevivência.

Quantificação de células de cloreto

Na quantificação de células de cloreto (Tabela 23) das lamelas primárias das brânquias, observou-se diminuição ($P < 0,05$) no número de células de cloreto do grupo controle para a maior concentração ($5,2\mu\text{g.L}^{-1}$), exceto no experimento 4. A comparação dos valores médios entre os experimentos nas mesmas concentrações (controle, 1,3, 2,6, $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$), não mostrou diferenças ($P > 0,05$).

Tabela 23. Quantificação de células de cloreto, por mm^2 de área, nas brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	$7,38 \pm 1,97^{Aa}$	$7,19 \pm 1,89^{Aa}$	$7,11 \pm 2,32^{Aa}$	$6,63 \pm 2,72^{Aa}$
$1,3\mu\text{g.L}^{-1}$	$6,75 \pm 2,18^{Aa}$	$6,97 \pm 2,44^{Aa}$	$6,36 \pm 2,34^{Aa}$	$6,58 \pm 2,07^{Aa}$
$2,6\mu\text{g.L}^{-1}$	$6,16 \pm 2,66^{Aa}$	$7,22 \pm 3,27^{Aa}$	$6,55 \pm 2,70^{Aa}$	$6,47 \pm 2,79^{Aa}$
$5,2\mu\text{g.L}^{-1}$	$3,00 \pm 1,23^{Ba}$	$4,05 \pm 1,95^{Ba}$	$3,36 \pm 1,86^{Ba}$	$4,47 \pm 1,94^{Aa}$

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$).

No presente estudo houve uma diminuição do número das células de cloreto, fato que pode ocorrer com adaptações e ajustes às variações ambientais (oxigênio, pH, temperatura) ou, à exposição ao Thiodan[®], que como outros tóxicos, pode provocar diminuição no número das células de cloreto, alterações estas observadas nos experimentos na concentração de $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$, exceto no experimento 4. Arellano (2004) também encontrou alterações quando estudou os efeitos de acumulação de cobre em linguado *Solea senegalensis*. Monteiro (2009) justificou uma diminuição das células de cloreto quando estudou a toxicidade do cobre em tilápias nilóticas, atribuindo a esse metal pesado a função de induzir necrose e apoptose das células de cloreto.

Segundo Machado (1999), o principal sítio de regulação iônica dos peixes são as brânquias, e as células mais correlacionadas a essa função são as células de cloreto ricas em mitocôndrias, as quais participam dos processos de transporte ativo de íons. Pesticidas orgânicos além de provocarem alterações nos epitélios das brânquias, podem alterar a atividade da Na-K-ATPase, e, dessa forma alterarem o fluxo normal dos íons.

Ao contrário dos resultados encontrados neste estudo, Wandelaar Bonga (1997) e Balm e Potinger (1993), observaram a proliferação das células de cloreto estimuladas pelo hormônio do estresse, o cortisol, e pela ação de mecanismos adaptativos locais.

Quantificação de células de muco

Dentro dos experimentos observou-se aumento ($P<0,05$) nos valores médios de células de muco no grupo controle para a maior concentração ($5,2\mu\text{g.L}^{-1}$), exceto no experimento 4 (Tabela 24).

Entre os experimentos ao comparar os grupos controle, no experimento 3 houve uma diminuição ($P<0,05$) de células de muco em relação aos demais. No grupo $1,3\mu\text{g.L}^{-1}$, comparando o experimento 1 com o 2 e 4 também houve uma diminuição. Nos experimentos 3 e 4 na concentração $2,6\mu\text{g.L}^{-1}$, verificou-se um aumento na quantificação de células de muco. Já na concentração $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$, houve um aumento no experimento 1 e 2 em relação ao experimento 3 e 4.

A maior quantidade de célula de muco se deu no grupo de concentração $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$, nos experimentos 1 e 2 que pode ser devido ao estresse, talvez por falta de um período de adaptação ao meio.

Monteiro (2009) em estudo histológico nas brânquias de tilápia nilótica expostas ao cobre, observou uma diminuição das células de muco após três dias de exposição à maior concentração, sugerindo uma hipersecreção precoce induzida por altas concentrações de cobre.

Tabela 24. Quantificação de células de muco, por mm^2 de área, nas brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	$0,80 \pm 0,92^{\text{Ba}}$	$0,86 \pm 0,96^{\text{Ba}}$	$0,72 \pm 0,65^{\text{Ab}}$	$0,77 \pm 0,86^{\text{Ba}}$
$1,3\mu\text{g.L}^{-1}$	$1,22 \pm 0,83^{\text{Ab}}$	$0,91 \pm 0,96^{\text{Bc}}$	$1,27 \pm 1,03^{\text{Ba}}$	$0,80 \pm 0,80^{\text{Bc}}$
$2,6\mu\text{g.L}^{-1}$	$0,91 \pm 0,73^{\text{Bc}}$	$0,97 \pm 0,73^{\text{Bc}}$	$1,13 \pm 0,83^{\text{Cb}}$	$1,27 \pm 1,03^{\text{Aa}}$
$5,2\mu\text{g.L}^{-1}$	$1,22 \pm 0,87^{\text{Ab}}$	$1,47 \pm 1,10^{\text{Aa}}$	$1,08 \pm 0,96^{\text{Cb}}$	$0,77 \pm 0,86^{\text{Bc}}$

Valores expressos como média \pm desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$).

Teste DUNCAN.

Diâmetro de células de cloreto e de células de muco

Analisando o experimento 1 e comparando o grupo controle com as demais concentrações, verificou-se nos valores médios que não houve diferença ($P > 0,05$); no entanto, quando comparada a concentração $1,3\mu\text{g.L}^{-1}$ com a $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$ encontrou-se diminuição ($P < 0,05$) no diâmetro das células de cloreto; o mesmo foi observado entre as concentrações $2,6\mu\text{g.L}^{-1}$ e $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$. Dentro dos experimentos 2, 3 e 4, não foi encontrada diferença ($P > 0,05$) ao analisar o diâmetro das células de cloreto (Tabela 25).

Ao comparar o experimento 1 com o 2 não se observou diferença ($P > 0,05$). Quando comparando o experimento 1 com 3 e com 4, observou-se diminuição ($P < 0,05$) entre os valores médios no diâmetro das células de cloreto. Quando se comparou o experimento 2 com os experimentos 3 e 4 também houve diminuição mas não houve diferença quando se comparou o experimento 3 com o 4.

Comparando a concentração $1,3\mu\text{g.L}^{-1}$ entre os experimentos 1 e 2 não houve diferenças nos valores médios do diâmetro das células de cloreto. Quando se compara o experimento 1 com 3 e 1 com 4, observou-se diminuição nos valores médios de diâmetro das células de cloreto. Comparando o experimento 2 com 3 e 2

com 4 também observou diferença ($P < 0,05$). Já entre os experimentos 3 e 4 não foi observada diferença nos valores médios do diâmetro das células de cloreto.

Comparando o grupo $2,6\mu\text{g.L}^{-1}$ entre o experimento 1 e 2 não houve diferença ($P > 0,05$). Quando comparado o experimento 1 com 3 e com 4 verificou-se diminuição nos valores médios do diâmetro da célula de cloreto. Entre os experimentos 2 com 3 e 4, observou-se diferença ($P < 0,05$). Entre os experimentos 3 e 4 não houve diferença ($P > 0,05$). Na concentração $5,2\mu\text{g.L}^{-1}$ quando se comparou os experimentos entre si não verificou diferença ($P > 0,05$). Os mesmos resultados foram encontrados por Barreto (2007) ao estudar a morfologia de brânquias de matrinxã (*Brycon Cephalus*) expostos aos organofosforado metil paration, não encontrando alterações de diâmetro de células de muco, ou seja, hipertrofia.

Tabela 25. Diâmetro (μm) de células cloreto das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	12,65±2,01 ^{Ba}	11,78±2,17 ^{Aa}	9,47±1,08 ^{Ab}	9,45±1,06 ^{Ab}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	13,83±1,76 ^{ABa}	12,21±1,57 ^{Aa}	10,28±1,76 ^{Ab}	10,35±1,70 ^{Ab}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	13,33±1,75 ^{ABa}	12,39±1,58 ^{Aa}	10,09±0,97 ^{Ab}	10,06±0,82 ^{Ab}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	11,10±1,41 ^{BCa}	11,15±1,28 ^{Aa}	10,18±1,10 ^{Aa}	10,03±0,96 ^{Aa}

Valores expressos como média±desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$).

Na análise do diâmetro das células de muco, dentro e entre os experimentos, não foram encontradas diferenças nos valores médios ($P > 0,05$) (Tabela 26).

Tabela 26. Diâmetro (μm) de células muco das brânquias de fêmeas de *A. bimaculatus*.

Grupo	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	11,15±1,84 ^{Aa}	10,60±2,07 ^{Aa}	10,98±2,22 ^{Aa}	10,75±2,35 ^{Aa}
1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$	10,41±1,86 ^{Aa}	10,66±1,99 ^{Aa}	10,70±1,81 ^{Aa}	9,97±1,96 ^{Aa}
2,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$	11,36±1,78 ^{Aa}	11,21±1,44 ^{Aa}	11,17±1,61 ^{Aa}	11,02±1,97 ^{Aa}
5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	10,33±3,05 ^{Aa}	11,22±1,76 ^{Aa}	11,56±1,89 ^{Aa}	11,47±2,18 ^{Aa}

Valores expressos como média±desvio padrão.

Valores com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$).

Valores com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha são diferentes ($P < 0,05$).

Neste trabalho observou-se que houve diminuição do diâmetro de células de cloreto e células de muco, gerando uma possível hipotrofia, devido ao binômio dose-temperatura (variações ambientais), e à ação do endosulfan.

Ao contrário dos resultados encontrados neste trabalho, Pawert et al. (1998) e Gernhöfer et al. (2001) propuseram, um critério semi-quantitativo para estimar alterações citoplasmáticas em peixes, e as mais comuns foram a hiperplasia das células epiteliais de brânquias, levando à fusão de lamelas secundárias.

CONCLUSÕES

A CL₅₀-96h do Thiodan[®] para fêmeas de *A. bimaculatus* em maturação avançada foi de 13,6µg.L⁻¹, com intervalo de confiança de 10,1 a 18,4 µg.L⁻¹, concluindo-se que o lambari é um possível bioindicador nativo.

Os efeitos do Thiodan[®] na maior concentração (5,2µg.L⁻¹) causaram comportamento anormal nos peixes.

O maior índice de mortalidade de peixes ocorreu no experimento 1, devido à reação do tóxico com o aumento da temperatura da água que atingiu a média 26,9°C, superior aos demais experimentos.

O efeito deste agrotóxico, mesmo em concentrações baixas (1,2µg.L⁻¹), pode ser mais lesivo quando a temperatura da água for mais elevada.

A ação tóxica do Thiodan[®] levou ao comprometimento das brânquias com alterações de estrutura do epitélio branquial, podendo este órgão ser considerado um biomarcador de contaminação ambiental por este agrotóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2. ed. ABNT: versão corrigida 31/03/2006, 19p, 2006.

ARAÚJO, F. G.; SIMONI, M. R. F. Relação peso-comprimento do lambari rabo vermelho (*Astyanax fasciatus paraybae*) e do lambari rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) na represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, p. 453-458, 1997.

ADAMS, W. J. Aquatic toxicology testing methods. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. L., Jr.; CAIRNS, Jr. **Handbook of Ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2002. cap. 13, p. 25-46.

ARELLANO, J. M; STORCH, V; SARASQUETE, C. Ultrastructural and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, p. 452-460, 2004.

BALLESTEROS, M. L.; WUNDERLIN, D. A.; BISTONI, M.A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p.199-205, 2009.

BALM, P. H. M. Immune-endocrine interaction. In: IWAMA, G. W. et al (ed). **Fish stress and health in aquaculture**, Cambridge, University Press, p. 195-221, 1997.

BAYER. Thiodan® (endosulfan). Disponível em: www.bayercropscience.com.br. Acesso em: 09/03/2010.

BARRETO, T. R. **Alterações morfuncionais e metabólicas no teleosteo de agua doce matrixan, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600BR®)** Sao Carlos: UFSCar, 2007. 79 f.

BLOOMQUIST, J. R. Ion channel as targets for insecticides. **Annual Reviews Entomology**, v. 41, p. 163-190, 1996.

BRASIL. 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, 2006. 19p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução RDC nº 28 de 9 de agosto de 2010**. Diário Oficial da União de 16/08/10, Seção 1, p. 64. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/Legislacao>. Acesso em: 06/07/2010.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: Sistemática. In: Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguai. **Poluição e Piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, p.79-108, 1972.

BUCKUP, P. A. Astyanax. In: BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. (Eds.) **Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil**. Versão 2. ed. 2003. Online. Disponível em: <http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo>. Acesso em: 13/02/2011.

CEMIG/CETEC - COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrativo de peixes do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG, 2000. 144p.

CAPKIN, E; ALTINOK, I; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, v. 64, p. 1793–1800, 2006.

CENGIZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 22, p. 200-204, 2006.

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

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. (2009) Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em: 11/07/2010.

CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: www.mma.gov.br. Acesso em: 12/07/2010.

CORREA, C. M. D.; OLIVEIRA, J. J. V.; TORNISIELO, V. L. Avaliação do nível residual teórico e experimental de endosulfan em óleo de soja (*Glycine max.* (L) Merrill). **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. v. 11, p. 137-148, 2001.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOT, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pesticides Science**, v. 8, p. 651-660, 1977.

DUKE, E. **Peixes do rio Paranapanema**. Geração Paranapanema. São Paulo: Horizonte Geográfico, 2003. 112 p.

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

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

ENGELHARDT, G. T.; SARMENTO, R. **Comportamento ambiental do thiodan CE (endosulfan) usado no controle químico da broca do fruto do cafeeiro**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, 2004. Disponível em: www.seculodiario.com.br. Acesso em: 10 de julho de 2009.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak river, Turkey, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 418-425, 2000.

ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: **Chemistry of plant protection**. Berlin: Spring-Verlag, 6:67-68, 1990.

FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, p. 119-130, 2003.

FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds.). **Fish adaptations**. USA: Science Publishers. 2003. cap. 9, p. 203-231.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J. V.; GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 103-109, 2007.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia Geral**. Editora Guanabara Koogan, 2004. 367p.

FISHBASE. **Astyanax bimaculatus**. (2009). Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 12/07/2010.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. et al. Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to treated sewage water. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1057-1063, 2008.

FRACÁCIO, R. **Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com Danio rerio (Cypriniforme, Cyprinidae) e análises limnológicas para a avaliação ambiental dos reservatórios do Médio e Baixo Tietê (SP)**. [Dissertação Mestrado em Engenharia]. Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2001. 233 p.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S. M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 376-381, 2007.

GERNHOFER, M., M. PAWET, M.; SCHRAMM, E.; MULLER R. Tribskorn, 2001. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8: 241-260.

HUET, M. **Tratado de piscicultura**. 3. ed. Madri: Mundi Prensa, 1983. 788p.

JAGOE, C. H; HAINES, T. A. Changes in gill morphology of atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environmental Pollution**, v. 97, p. 137-146, 1997.

KARAN, V.; VTOROVIC, S.; TUTUNDŽIC, V.; POLEKSIC, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 49-55, 1998.

KARLSSON-NORRGREN, L. et al. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-uchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v. 27, p. 81-95, 1985.

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. Jundiaí: CIP–USP Editora, 1997. 97p.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1. ed. Jundiaí: Acqua Supre, 2000. 285p.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, H.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedes in Characidae. p. 106-169, 2003. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. J. (eds.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729p.

MACHADO, M. R. The use of fish gills as indicators of water quality. **UNOPAR Científica Ciências e Biologia da Saúde**. v.1, p. 63-76, 1999.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian of Journal Fisheries Aquatic Sciences**, v. 42, p. 630-648, 1985.

MAZON, A. F.; CERQUIERA, C. C. C; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the south American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research Section A**. v. 88, p. 52 – 63, 2002.

MONTEIRO, S. M.; ROCHA, E.; MANCERA, J. M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; SOUSA, M. A stereological study of copper toxicity in gills of *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol.* **Environmental Safety**, v. 72, p. 213–223, 2009.

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

MUSANHI, R. G. Influence of two organochlorine pesticides, Thiodan and Lindane on survival of fingerlings of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. United Nations Development Program - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research**. 1987. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 16 de julho de 2010.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 53, p. 331-347, 2002.

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

PEEBUA, P.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK1, P.; SINGHAKAEW, S.. Histopathological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* in acute and subchronic alachlor exposure. **Journal Environmental Biology**, v. 29, p. 325-331, 2008.

PINHEIRO, S.; NARS, N. Y.; LUZ, D. **Agricultura ecológica e a máfia dos agrotóxicos no Brasil**. Rio de Janeiro: Edição dos Autores, 1998. 355p.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDIZIG, V. Fish gills as monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MULLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and Chronic effects of Pollutants on freshwater fish**. United Nation: Fishing News Books, 1994. cap. 30, p. 339-352.

PAWERT, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. **Tissue and Cell**, v. 30, p. 617-626, 1998.

RANZANI-PAIVA, M. J.; VIEIRA, A. L.; ISHIKAWA, C. M. Análise dos Constituintes do Plasma Sanguíneo da Carpa. *Cyprinus carpio*, infesta por *Argulus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 16, p. 117-121, 1997.

RODRIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidade)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 139p. 2007.

SAEG – **Sistema para análises estatísticas**. UFV, Central de Processamento de Dados. Viçosa, MG, 1999.

SANTOS, D. C. M. **Toxidez aguda do zinco em *Lambaris Astyanax aff.bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 111p. 2009.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluated contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 75-86, 1997.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. São Paulo: FUNEP. 1994. 72 p.

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

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 1117-1127, 2003.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology**. Normal and pathological features. 2 ed. New York: Fisher, 1995. 195p.

TEMMINK, J.; BOUWMEISTER, P.; DE JONG, P.; GOERING, P. L.; WAALKES, M. P.; KLAASEN, C. D. An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquatic Toxicology**, v.4, p.165-179, 1983.

TRIEBSKORN, R.; KÖHLER, H. R.; HONNEM, W.; SCHRAMM, M.; ADAMS, S. M.; MÜLLER, E. F. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations in fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, p. 57-73, 1997.

TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; HEYD, A.; EIKEMPER, R.; KÖHLER, H.-R.; SCHWAIGER, J.. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Aquatic Toxicology**, 68,151-166, 2002.

, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, São Paulo: SBI, 1996. 169 p.

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

WANDELLAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-652, 1997.

WARE, G. W. An introduction to insecticides. [Monografia] University of Minnesota, 2004. Disponível em: <http://ipmword.umn.edu>. Acesso em: 15/10/2010.

WINKALER, E. U et al. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 507-514, 2001.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Editora Rima, 2008. 478 p.

CONCLUSÕES GERAIS

A CL₅₀-96h do Thiodan[®] para fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* em maturação avançada foi de 13,6µg.L⁻¹, indicando que o lambari é um possível bioindicador nativo.

O Thiodan[®] mostrou-se tóxico comprometendo as funções vitais das brânquias por alterações na estrutura do epitélio lamelar.

A ação tóxica deste produto nas brânquias das fêmeas de lambaris em maturação avançada indica que há a necessidade de continuação da pesquisa sobre o comportamento da espécie frente à toxicidade do Thiodan[®].

O Thiodan[®] é um organoclorado pertencente a uma classe de contaminantes que exhibe potencial significativo para bioacumulação na biota aquática, podendo provocar alterações ambientais que justificam a continuidade de pesquisa sobre seus efeitos no meio ambiente.

O presente trabalho foi de fundamental importância, tanto academicamente quanto empiricamente, agregando conhecimentos teóricos e técnicos sobre a temática dos agrotóxicos como um dos principais agentes contaminantes do ecossistema aquático, comprometendo a sobrevivência das espécies que nele habitam.

ANEXO

Tabelas de valores dos parâmetros físicoquímicos da água nos quatro experimentos.

Tabela 1. Valores de parâmetros físicoquímicos da água no experimento 1.

Análise	Início	Fim			
		Controle	Concentração 1,3 µg.L ⁻¹	Concentração 2,6 µg.L ⁻¹	Concentração 5,2 µg.L ⁻¹
pH	7,16	7,22	7,27	7,02	7,3
Cor aparente	0	0	0	0	5
Temperatura	26,8	26,8	27,1	26,9	26,9
Turbidez (NTU)	0,55	1,10	0,90	0,73	0,67
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	6,7	5,9	5,9	6,0	6,2
DBO (mg.L ⁻¹)	0,2	1,2	0,8	0,6	5,4
Cloro (CL ₂) (mg.L ⁻¹)	0	0	0	0	0
Cloreto (Cl ⁻¹) (mg.L ⁻¹)	3,47	2,23	3,34	3,71	4,83
Cloreto (NaCl) (mg.L ⁻¹)	5,72	1,35	2,03	2,25	2,93
Nitrato (NO ₃ ⁻) (mg.L ⁻¹)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Dureza Total (CaCO ₃ /L mg.L ⁻¹)	18,95	26,88	23,52	26,88	23,52
Dureza de cálcio (Ca ²⁺) (mg.L ⁻¹)	13,19	18,76	17,68	18,76	23,17
Teor de cálcio (Ca ²⁺) (mg.L ⁻¹)	5,55	7,52	8,95	7,52	11,38
Dureza de Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	7,64	11,24	2,17	11,24	11,38
Teor de Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	1,85	2,73	5,78	2,73	2,86

Tabela 2. Valores de parâmetros físicoquímicos da água no experimento 2.

Análise	Início	Fim			
		Controle	Concentração 1,3 µg.L ⁻¹	Concentração 2,6 µg.L ⁻¹	Concentração 5,2 µg.L ⁻¹
pH	7,06	6,95	6,75	6,79	6,95
Cor aparente	0	0	5	5	5
Temperatura	25,4	25,4	25,6	25,5	25,4
Turbidez (NTU)	0,513	6,60	2,37	1,33	2,23
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	6,6	6,0	6,4	6,8	6,8
DBO (mg.L ⁻¹)	5,0	4,6	4,8	4,0	7,6
Cloro (CL ₂) (mg.L ⁻¹)	0	0,03	0	0	0
Cloreto (Cl ⁻¹) (mg.L ⁻¹)	3,4	3,37	3,6	3,15	3,15
Cloreto (NaCl) (mg.L ⁻¹)	5,6	5,56	5,94	5,19	5,19
Nitrato (NO ₃) (mg.L ⁻¹)	0,2	0,6	0,6	,05	0,6
Dureza Total (CaCO ₃ /L mg.L ⁻¹)	17,8	25,9	27,8	27,4	26,4
Dureza de cálcio (Ca ²⁺) (mg.L ⁻¹)	20,2	22,8	22,8	22,8	19,6
Teor de cálcio (Ca ²⁺) (mg.L ⁻¹)	8,1	9,2	9,2	9,2	7,8
Dureza de Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	12,1	13,6	13,6	13,6	11,8
Teor de Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	2,9	3,3	3,3	3,3	2,9

Tabela 3. Valores de parâmetros físicoquímicos da água no experimento 3.

Análise	Início	Fim			
		Controle	Concentração 1,3 µg.L ⁻¹	Concentração 2,6 µg.L ⁻¹	Concentração 5,2 µg.L ⁻¹
pH	7,21	7,12	7,50	7,13	7,42
Cor aparente	5	0	0	5	5
Temperatura	24,8	24,8	24,7	24,4	24,4
Turbidez (NTU)	1,90	1,80	2,87	1,89	2,20
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	7,2	6,7	6,4	6,8	7,2
DBO (mg.L ⁻¹)	2,4	4,2	5,4	3,0	3,4
Cloro (CL ₂) (mg.L ⁻¹)	0	0	0	0	0
Cloreto (Cl ⁻¹) (mg.L ⁻¹)	3,15	4,5	5,28	6,30	3,6
Cloreto (NaCL) (mg.L ⁻¹)	5,20	7,42	8,71	10,39	5,94
Nitrato (NO ₃ ⁻) (mg.L ⁻¹)	1,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Dureza Total (CaCO ₃ /L) (mg.L ⁻¹)	34,6	31,68	34,56	35,52	40,32
Dureza de cálcio (Ca ²⁺) (mg.L ⁻¹)	20,4	15,50	17,95	17,95	19,58
Teor de cálcio (Ca ²⁺) (mg.L ⁻¹)	8,18	8,50	9,15	9,15	9,81
Dureza de Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	12,22	7	8,8	8,8	9,77
Teor de Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	2,95	1,70	12,13	12,13	2,37

Tabela 4. Valores de parâmetros físicoquímicos da água no experimento 4.

Análise	Início	Fim			
		Controle	Concentração 1,3 µg.L ⁻¹	Concentração 2,6 µg.L ⁻¹	Concentração 5,2 µg.L ⁻¹
pH	7,10	6,79	7,38	7,30	7,21
Cor aparente	5	2,6	10	10	10
Temperatura	25,0	25,0	24,5	24,7	24,7
Turbidez (NTU)	1,38	1,37	2,01	1,32	2,47
O ₂ aq (mg.L ⁻¹)	7,5	6,3	6,8	7,0	7,2
DBO (mg.L ⁻¹)	1,0	4,0	5,2	5,0	5,8
Cloro (CL ₂) (mg.L ⁻¹)	0	0,03	0,04	0,02	0,03
Cloreto (Cl ⁻¹) (mg.L ⁻¹)	1,12	2,7	2,7	2,92	3,37
Cloreto (NaCL) (mg.L ⁻¹)	1,84	4,45	4,45	4,85	5,56
Nitrato (NO ₃ ⁻) (mg.L ⁻¹)	0,1	0,01	0,1	0,1	0,1
Dureza Total (CaCO ₃ /L) (mg.L ⁻¹)	26,88	21,12	26,88	30,72	36,48
Dureza de cálcio (Ca ²⁺) (mg.L ⁻¹)	16,32	22,03	26,92	27,74	26,11
Teor de cálcio (Ca ²⁺) (mg.L ⁻¹)	6,54	10,79	10,79	11,11	10,46
Dureza de Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	9,78	11,23	18,74	16,63	15,65
Teor de Mg ²⁺ (mg.L ⁻¹)	2,37	2,72	4,55	4,04	3,80