

DIEGO SENRA LOPES

**EFEITOS DO INSETICIDA DIMILIN® NA MORFOLOGIA DE BRÂNQUIAS
DE MACHOS E FÊMEAS DE *Hyphessobrycon eques* ADULTOS
(Steindachner,1882)**

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

2015

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

T

L864e
2015
Lopes, Diego Senra, 1989-
Efeitos do inseticida Dimilin® na morfologia de brânquias
de machos e fêmeas de *Hyphessobrycon eques* adultos
(Steindachener, 1882) / Diego Senra Lopes. – Viçosa, MG, 2015.
x, 60f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.50-59.

1. Peixe. 2. *Hyphessobrycon eques*. 3. Brânquias.
4. Marcadores biológicos. 5. Inseticida - Toxicologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 597.48

DIEGO SENRA LOPES

**EFEITOS DO INSETICIDA DIMILIN® NA MORFOLOGIA DE BRÂNQUIAS
DE MACHOS E FÊMEAS DE *Hyphessobrycon eques* ADULTOS
(Steindachner,1882)**

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 em: 16 de julho de 2015.

Profa. Dra. Marlene I. Vargas Vilorio

Prof. Dr. Lucas Marcon

Profa. Dra. Ann Honor Munteer
(Coorientadora)

Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio e incentivo, por terem caminhado comigo durante toda essa jornada, acreditando em meu esforço e ensinando-me a superar os obstáculos, tornando possível a realização de mais uma conquista em minha vida. Conquista essa que é nossa!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e coragem para enfrentar os desafios e permitir esta conquista.

Ao Laércio dos Anjos Benjamin, orientador e amigo, um verdadeiro exemplo de profissionalismo e competência que quero seguir. Obrigado pela confiança e oportunidade de crescimento, pelo incentivo, conselhos e ensinamentos que levarei comigo para o resto da vida. Pela paciência e por estar sempre disposto a ajudar-me nas horas em que mais precisei. Obrigado pela amizade e pelos conhecimentos que adquiri durante todos esses anos de convivência, que contribuíram para o meu aprendizado e crescimento pessoal e profissional e foram essenciais para que este estudo pudesse ser realizado. Obrigado por tudo!

Aos meus pais, Paulo e Rosalina, honestidade, caráter e doação, e que em meio a tantas dificuldades, sempre deram o sangue e suor para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigado pelo amor incondicional, apoio e incentivo em minhas escolhas, pelos conselhos e ensinamentos, e por me ensinarem a lutar pelos meus sonhos e nunca desistir. Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje. Sem vocês não teria chegado até aqui!

Aos meus avós, Wilson e Lodônia (in memoriam), e a minha avó Nadir (Didi), que me ajudaram como puderam de todas as formas. Obrigado pelas orações, pelo amor e carinho de Vó e Vô. Vocês, sem dúvida, são partes dessa conquista.

À professora Ann Honor Mounteer, pela coorientação.

À professora Ana Teresa por ter feito parte da minha vida acadêmica, pelos conhecimentos transmitidos e pelas oportunidades concedidas durante a graduação.

Ao professor Cláudio Fonseca, por ter aceitado participar como membro suplente.

Aos membros da banca examinadora pelas críticas, sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Peixes, Paulo e Lucas, (que puderam passar um pouco de tudo que aprenderam pela experiência já vivida no laboratório,

contribuindo e ajudando durante os experimentos), e Fausto e Giselle (pela convivência e pelos momentos de descontração).

Às minhas “irmãs”, amigas e companheiras de trabalho, Amara e Mila, pela amizade, conselhos, pelas risadas e broncas. Obrigado por compartilhar os momentos mais felizes, e pelas palavras de conforto nos momentos mais difíceis. Obrigado por fazerem parte dessa jornada do começo ao fim, e por tornarem o ambiente de trabalho sempre mais alegre.

Aos “irmãos” da República Nova Balla, André (Bertollo), Diego (Camelo), Paulo Henrique e Gustavo (Freire), pela amizade, risadas, conselhos, paciência e também pela ajuda nas horas mais difíceis, e por todos os bons momentos que compartilhamos durante todos esses anos de convivência. Valeu por tudo, família Nova Balla!

Aos meus amigos Andressa, Danilo e Mari. Obrigado por fazerem parte dos melhores momentos, por todos os almoços em “família” aos domingos e, acima de tudo, pela amizade.

À minha amiga “mula” (Priscila), pela amizade, conselhos e por sempre ouvir meus desabafos.

À minha amiga Ludmila, e aos seus pais Sergio e Heloisa, pela amizade, carinho e conselhos, pelo apoio e ajuda, e por me acolherem no momento em que mais precisei.

Aos meus amigos Matheus e Warley, pela amizade, risadas e conselhos.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante todo o mestrado.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com este trabalho e fizeram parte de mais essa etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

Diego Senra Lopes, filho de Paulo Basques Lopes e Rosalina Senra Lopes, nasceu em 11 de julho de 1989, na cidade de Ubá, Minas Gerais.

Cursou o Ensino Fundamental e Médio na Escola Estadual Doutor João Pinto, em Tocantins-MG.

Graduou-se em Ciências Biológicas em dezembro de 2010, pela Faculdade Santa Marcelina (FASM), Muriaé-MG.

No ano de 2009, participou do Programa de Iniciação Científica da FASM, Muriaé-MG.

Em 2009 e 2010, participou do programa “Bolsa Estágio” da Secretaria Municipal de Educação de Muriaé-MG, em parceria com a Faculdade Santa Marcelina, atuando como Monitor em Escolas e Creches da cidade de Muriaé-MG.

Em agosto de 2011 iniciou disciplinas como estudante não-vinculado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, em novembro de 2012, defendendo a dissertação em julho de 2015.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Testes ecotoxicológicos.....	3
2.2. O consumo de agrotóxicos no Brasil.....	5
2.3. Contaminação dos ambientes aquáticos por agrotóxicos	7
2.4. O inseticida diflubenzuron	8
2.5. Peixes como bioindicadores da qualidade da água	10
2.6. Biomarcadores em peixes.....	11
2.6.1. Histopatologia de peixes.....	13
2.7. O peixe mato grosso <i>Hyphessobrycon eques</i>	14
2.8. Características gerais de brânquias dos peixes teleósteos.....	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Normas de conduta para uso de animais na pesquisa.....	18
4.2. Animais	18
4.3. Análises de água.....	19
4.4. Desenho experimental	19
4.5. Obtenção dos dados biométricos.....	20
4.6. Coleta de amostras e processamento para estudo histológico.....	20
4.7. Análises morfológicas	21
4.8. Análises estatísticas.....	24
5. RESULTADOS	24
5.1. Análises de água.....	24
5.2. Dados biométricos.....	25
5.3. Análises morfológicas	26
5.3.1. Análises histopatológicas.....	27
5.3.2. Análises morfométricas	32
5.3.2.1. Sistema vascular.....	32

5.3.2.2. Espessura do epitélio lamelar primário.....	34
5.3.2.3. Comprimento das lamelas primárias.....	35
5.3.2.4. Comprimento das lamelas secundárias.....	36
5.3.2.5. Quantificação dos focos de hemorragias.....	38
5.3.2.6. Quantificação das células de cloreto.....	38
5.3.2.7. Quantificação das células de muco.....	39
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

RESUMO

LOPES, Diego Senra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Efeitos do inseticida Dimilin[®] na morfologia de brânquias de machos e fêmeas de *Hyphessobrycon eques* adultos (Steindachner, 1882).** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadora: Ann Honor Mounteer.

O uso intensivo de agrotóxicos na agricultura tem levado à contaminação dos ambientes aquáticos. O diflubenzuron (Dimilin[®]) é um inseticida bastante usado em áreas agrícolas no combate a pragas de insetos e tem sido frequentemente utilizado nas pisciculturas devido à sua eficácia no controle de ectoparasitas em peixes. O uso indiscriminado deste inseticida nas pisciculturas pode resultar em toxicidade causando danos à saúde dos peixes. O objetivo desse trabalho foi discriminar a possível influência do sexo dos peixes em resposta à ação do inseticida Dimilin[®], e determinar se a exposição subletal a este inseticida causa alterações na morfologia das brânquias de machos e fêmeas de *Hyphessobrycon eques*. Os peixes foram expostos às concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de Dimilin[®] por 96 h e 17 dias. No experimento de 96 h foi realizada uma única aplicação do tóxico na água, e no experimento de 17 dias foram realizadas duas aplicações, sendo uma no primeiro dia e a outra no quarto dia de experimento. Ao final do experimento, amostras do tecido branquial de 10 animais de cada grupo foram coletados e processados para estudo histológico. Foram analisados dados morfométricos e histopatológicos em 10 campos por animal. A análise da água mostrou-se em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais. Alterações histológicas foram encontradas nas brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*. As análises histopatológicas e morfométricas mostraram diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as concentrações dentro de um mesmo experimento no mesmo sexo. O Índice de Alteração Histopatológica (IAH), tanto em machos quanto em fêmeas, foi maior nas maiores concentrações (0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) nos experimentos de 96 h e 17 dias, indicando diferenças na comparação com o grupo controle e entre as concentrações dentro de um mesmo experimento. O Valor Médio de Alteração (VMA) foi maior em todos os grupos expostos ao Dimilin[®] nos tempos de exposição de 96 h e 17 dias em comparação com grupo controle. O IAH, o VMA e as análises morfométricas não mostraram reação específica do sexo, indicando que as brânquias de machos e fêmeas não reagiram de maneira diferente ($P > 0,05$) após exposição a concentrações subletais do inseticida Dimilin[®]. Os resultados mostraram que mesmo nas concentrações mais baixas, o inseticida causou alterações morfológicas leves a moderadas nas brânquias de machos e fêmeas, comprometendo a função deste tecido. Assim, *H. eques* pode ser considerado bioindicador da contaminação ambiental por Dimilin[®], e ser utilizado como modelo em ensaios toxicológicos e avaliações ambientais.

ABSTRACT

LOPES, Diego Senra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Effects of Dimilin[®] insecticide in gills morphology of males and females of *Hyphessobrycon eques* adults (Steindachner, 1882).** Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-adviser: Ann Honor Munteer.

The intensive use of pesticides in agriculture has caused contamination of aquatic environments. Diflubenzuron (Dimilin[®]) is a widely used insecticide for agricultural areas in combating insect pests, and has been frequently used in fish farms due to its effectiveness in the control of fish ectoparasites. The indiscriminate use of this pesticide in pisciculture can result in toxicity causing fish health problems. The aim of this study to discriminate the possible influence of sex of the fish in response to the action of Dimilin[®], to determine whether sublethal exposure to this pesticide causes changes in the morphology of the gills of male and female *Hyphessobrycon eques*. The fish were exposed to concentrations of 0.01, 0.1 and 1.0 mg.L⁻¹ Dimilin[®] for 96 hours and 17 days. In the 96 hour experiment a single application of toxic in water was carried out and in the 17 days experiment two applications were performed, one on the first day and another on the fourth day of the experiment. At the end of the experiment, gill tissue samples of 10 animals from each group were collected and processed for histological study. Morphometric and histopathological findings in 10 fields per animal were analyzed. Analysis of the water showed in to be in accordance with the conditions for cultivation and creation of tropical fish. Histological changes were found in the gills of male and female *Hyphessobrycon eques*. Histologic and morphometric analyses showed significant differences ($P < 0.05$) between the concentrations within the same experiment in the same sex. The histopathological alteration index (HAI), in both males and females was greater at higher concentrations (0.1 and 1.0 mg.L⁻¹) in the 96 hours and 17 days experiments, indicating differences in comparison with the control group and between the concentrations within the same experiment. The mean alteration value (MAV) was higher in all groups exposed to Dimilin[®] in exposure times of 96 hours and 17 days compared to the control group. The HAI, the MAV and the morphometric analysis did not show a specific reaction of sex, indicating that the gills of males and females do not respond differently ($P > 0.05$) after exposure to sublethal concentrations of insecticide Dimilin[®]. The results showed that even at lower concentrations the insecticide caused mild to moderate morphological changes in the gills of males and females, compromising tissue function. So, *Hyphessobrycon eques* can be considered bioindicator of environmental contamination by Dimilin[®] and be used as a model in toxicological tests and environmental assessments.

1. INTRODUÇÃO

A atividade aquícola tem se desenvolvido intensamente no Brasil nos últimos anos atingindo proporções consideráveis. Segundo o levantamento preliminar de 2013 do Ministério da Pesca e Agricultura, atualmente o país produz aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado, sendo 40% cultivados, gerando um PIB pesqueiro de R\$ 5 bilhões.

A criação de peixes ornamentais está incluída entre os setores mais lucrativos da piscicultura, tendo gerado em média 182 milhões de dólares ao ano na década de 1990, mesmo volume mundial de exportação em 2000, sendo Singapura o maior exportador, contribuindo com 23,9% do total, seguido da China com 10,6%. Em 2002, as importações de peixes ornamentais no mundo movimentaram 900 milhões de dólares (FAO, 2007).

No Brasil a piscicultura ornamental é relativamente recente, e tem como marco histórico a introdução de peixes ornamentais asiáticos em meados da década de 1920, no Rio de Janeiro (RJ), por imigrante de origem japonesa, Sigeiti Takase. Takase trouxe mais de 50 espécies para cultivo, e em águas brasileiras coletou várias espécies da ictiofauna nativa, algumas das quais passou a cultivar (BOTELHO-FILHO, 1990).

Com desenvolvimento e expansão deste setor, surgiram novas técnicas de criação com práticas de manejos inadequadas, resultando na má qualidade da água e no aparecimento de ectoparasitas, causando enfermidades nos organismos cultivados e prejuízos de ordem econômica. Esses predadores destacam-se como importantes redutores da produtividade, pois provocam atraso no crescimento dos animais e de altas taxas de mortalidade (RANZANI-PAIVA et al., 1997).

Entretanto, a falta de informações e de produtos químicos próprios para a aquicultura, leva ao uso indiscriminado de produtos de uso agrícola ou veterinário para o tratamento dos ectoparasitas. Entre os agroquímicos utilizados na aquicultura em geral, destaca-se o diflubenzuron (DFB), comercializado com o nome Dimilin[®], um inseticida com ação reguladora do crescimento de artrópodes, interferindo diretamente na biossíntese de quitina, componente fundamental do exoesqueleto destes organismos (EISLER, 1992). No geral, são poucos os estudos relacionados aos efeitos subletais deste inseticida em espécies de peixes de regiões neotropicais. Assim, considerando-se o uso intensivo e incorreto do Dimilin[®], tanto na agricultura quanto em sistemas de

cultivo de peixes, e os poucos dados sobre a ação deste inseticida para peixes neotropicais, torna-se necessário a realização de testes de toxicidade para avaliação do potencial efeito toxicológico deste produto.

A brânquia é um órgão de importância vital para os peixes, pois exercem funções como respiração, osmorregulação e excreção, além de constituírem o sítio de tomada de depuração e metabolismo dos agentes tóxicos. O contato direto com o ambiente aquático e a grande área de superfície são as principais razões que tornam as brânquias um órgão vulnerável à ação de poluentes, sendo o primeiro órgão a reagir contra as condições ambientais desfavoráveis (MATAQUEIRO et al., 2009; REISER et al., 2010; RASKOVIC´ et al., 2013; SONNE et al., 2014). Assim, os efeitos dos poluentes sobre a estrutura branquial vêm sendo muito estudados em peixes, coletados em ambientes poluídos ou expostos a testes em laboratório, e as alterações morfológicas e histométricas encontradas vêm sendo utilizadas como biomarcador útil da contaminação aquática (CAMARGO et al. 2009; HUED et al. 2012; SHIOGIRI et al. 2012; BARJA-FERNÁNDEZ et al. 2013; PROCÓPIO ET al., 2014; BARIŠIĆ et al., 2015).

Hyphessobrycon eques é uma espécie de peixe neotropical que habita a região inferior da coluna d'água, vivendo sempre em grandes cardumes. Possui grande importância econômica estando entre as espécies de peixes ornamentais de águas continentais mais exportadas pelo Brasil, sendo muitas vezes a principal fonte de renda de famílias que vivem da comercialização desses peixes. É sensível a mudanças em seu ambiente natural, apresentando-se como possível bioindicador das alterações ambientais causadas pelo Dimilin®. Nos últimos anos, esta espécie de peixe tem sido frequentemente utilizada em ensaios ecotoxicológicos por apresentar fácil adaptação em condições laboratoriais.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi discriminar a possível influência do sexo dos peixes em resposta à ação do inseticida Dimilin®, usando brânquias como biomarcador, e investigar os possíveis efeitos tóxicos subletais deste inseticida sobre as características morfológicas das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques* após exposição a diferentes concentrações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Testes ecotoxicológicos

Nestas últimas décadas, para se adquirir conhecimentos sobre os efeitos dos agentes químicos na biota aquática, têm sido utilizados testes com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, sob condições de campo e laboratório (ARAÚJO, 2000), onde se verifica a toxicidade dos compostos.

A primeira iniciativa em termos metodológicos se deu em 1975, num programa internacional de padronização de testes de toxicidade aguda com peixes, desenvolvido pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da International Organization for Standardization (ISO), com participação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) a convite da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). A partir de 1975, foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração, utilizando alguns grupos e espécies de organismos, dentre os quais se destacam as algas (ABNT, 1992, CETESB, 1994), os microcrustáceos (ABNT, 1993; CETESB, 1994) e os peixes (CETESB, 1990; ABNT, 2004) de águas continentais e marinhas, e testes com sedimentos (ZAGATTO e BERTOLETTI 2006).

Os testes de toxicidade aquática são ferramentas importantes na avaliação da contaminação em ambientes aquáticos e apresentam-se como mecanismos para a compreensão dos efeitos de impactos antropogênicos sobre este ambiente, utilizando-se de organismos vivos que atuam como bioindicadores. Por meio destes testes, tem sido possível avaliar o efeito de um grande número de produtos sobre diferentes espécies (CAMPAGNA, 2005). Eles ainda detectam a capacidade de um agente tóxico ou uma mistura em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos, permitindo saber em que medida as substâncias são nocivas, e como e onde se manifestam os efeitos (MAGALHÃES e FILHO, 2008).

Atualmente, muitos ensaios são padronizados nacionalmente pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e, internacionalmente, por órgãos como Association Française de Normalisation (AFNOR), American Society for Testing and Materials (ASTM), American Water Work Association (AWWA), Deutsches Institut für Normung (DIN), International Organization for Standardization (ISO), e pela Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) (ANJOS, 2009). A

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) também tem padronizado testes de toxicidade (COSTA e OLIVI, 2008).

De acordo com ZAGATTO e BERTOLETTI (2006), a escolha dos organismos baseia-se em alguns critérios importantes, como sua fácil disponibilidade, rápido ciclo de vida, ampla distribuição geográfica, fácil cultivo e manejo, importância na cadeia alimentar, fácil reprodutibilidade, alta sensibilidade, importância comercial, entre outros. Ainda, conforme os autores citados, a escolha também é diferenciada de região para região, pela praticidade e interesse de se trabalhar com organismos que existem na sua própria localidade. As exposições são feitas em diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, amostras de efluentes ou água bruta, por um determinado período de tempo (SCHVARTSMAN, 1991). Estes padrões ainda são usados em diversos trabalhos com ensaios ecotoxicológicos nos dias atuais (BORAN et al., 2010; HUED et al., 2012; SHIOGIRI et al., 2012; BENZE et al., 2014), e atendem às resoluções da ABNT (2007 e 2011) e também ao que propõem a OECD (1984 e 1992) e a USEPA (1984).

Existem os testes de toxicidade aguda, que medem efeitos sofridos por organismos em um curto período de exposição. Eles têm como objetivo estimar a dose ou concentração de um agente tóxico que seria capaz de produzir uma resposta específica mensurável em um organismo teste ou população, em um período de tempo relativamente curto, geralmente de 24 a 96 h. Os testes de toxicidade aguda permitem que valores de CE_{50} e CL_{50} sejam determinados por vários métodos estatísticos computacionais. Geralmente, os valores de concentrações efetivas e letais são expressos em relação a 50% dos organismos porque estas respostas são mais reprodutíveis, podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (COSTA e OLIVI, 2008). Existem ainda os testes de toxicidade crônica, cujos organismos são expostos continuamente a produtos tóxicos por um período de tempo significativo do ciclo de vida que pode variar da metade a dois terços do ciclo (RAND e PETROCELLI, 1985). Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações subletais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (COSTA e OLIVI, 2008). Os testes de toxicidade crônica dependem diretamente dos resultados

dos testes de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir da CL_{50} por meio de métodos estatísticos tais como o método Probit, o método Logit e os métodos Spearman-Karber e trimmed Spearman-Karber. Os dois primeiros são métodos paramétricos que transformam os dados da curva dose-resposta em uma função matemática conhecida ou esperada antes dos valores de CL_{50} e CE_{50} serem estimados e os métodos Spearman-Karber e trimmed Spearman-Karber são métodos não paramétricos que não estão sujeitos a esses problemas, têm boas propriedades estatísticas, são fáceis de usar e recomendados para cálculos precisos de CE_{50} e CL_{50} com intervalo de confiança de 95% (COSTA e OLIVI, 2008).

Em ambientes aquáticos, a ocorrência dos efeitos crônicos é mais frequente devido à diluição dos poluentes oriunda das águas de contribuição, às relações antagonistas entre as substâncias, à rápida associação que ocorre entre a maioria das partículas e a matéria húmica, e à sedimentação de sólidos em suspensão. Desta forma, os organismos se expõem a baixas concentrações de determinados poluentes durante longos períodos de tempo (STEPHAN e MOUNT, 1973), manifestando efeitos crônicos em níveis subletais e, até mesmo, letais ao longo do tempo.

2.2. O consumo de agrotóxicos no Brasil

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. Nos últimos dez anos, enquanto o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190% (ANVISA, 2012). Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Na safra que envolveu o segundo semestre de 2010 e o primeiro semestre de 2011, o mercado nacional de venda de agrotóxicos movimentou 936 mil toneladas de produtos, das quais 833 mil toneladas produzidas no país e 246 mil toneladas importadas (ABRASCO, 2015).

Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos. Em 2011, houve um aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, sendo que as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representam 80% do total das vendas do setor (SINDAG, 2012). Os Estados Unidos foram responsáveis por 17% do mercado mundial, que girou em torno de US\$ 51,2 bilhões (ANVISA, 2012). A tabela 1 mostra o crescente consumo

de agrotóxicos e fertilizantes químicos pela agricultura brasileira, proporcional ao aumento das monoculturas, cada vez mais dependentes dos insumos químicos.

Tabela 1. Consumo de agrotóxicos e fertilizantes nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011.

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Agrotóxicos (milhões de L)	599,5	643,5	693,0	706,2	687,5	686,4	673,9	725,0	827,8	852,8
Fertilizante (milhões de Kg)	4.910	5.380	6.210	6.550	6.170	6.070	6.240	6.470	6.497	6.743

Fontes: SINDAG (2009, 2011), ANDA (2011), IBGE/SIDRA (1998-2011) e MAPA (2010).

Nota-se que o consumo médio de agrotóxicos vem aumentando em relação à área plantada, ou seja, passou-se de 10,5 litros por hectare (L/ha) em 2002 para 12 L/ha em 2011. O aumento está relacionado a vários fatores, como a expansão do plantio da soja transgênica, que amplia o consumo de glifosato, a crescente resistência das ervas “daninhas”, dos fungos e dos insetos demandando maior consumo de agrotóxicos, e o aumento de doenças nas lavouras, como a ferrugem asiática na soja, o que aumenta o consumo de fungicidas (ABRASCO, 2015). Importante estímulo ao consumo advém da diminuição dos preços e da absurda isenção de impostos dos agrotóxicos, fazendo com que os agricultores utilizem maior quantidade por hectare (PIGNATI; MACHADO, 2011). Quanto aos fertilizantes químicos, a média de consumo por hectare continuou no mesmo nível no período.

Outra constatação refere-se à existência de uma concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados. Os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas por 12% e as demais categorias de agrotóxicos, por 29% (ABRASCO, 2015).

Cerca de 430 ingredientes ativos (IAs), 750 produtos técnicos e 1.400 formulações de agrotóxicos estão autorizados pelo Ministério da Saúde (MS) e pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) e registrados no MAPA (ABRASCO, 2015) e são permitidos no Brasil, de acordo com os critérios de uso e indicação estabelecidos

em suas monografias. Porém, dos cinquenta mais utilizados nas lavouras de nosso país, 22 são proibidos na União Europeia.

Nos últimos anos, tornou-se muito comum no Brasil o uso de agrotóxicos em sistemas de criação de peixes para o combate de ectoparasitos. Estes se destacam como os principais causadores de danos à saúde desses animais e de prejuízo de ordem econômica, pois provocam atraso no crescimento, afetam a reprodução, provocam deficiências na conversão de alimentos, são vetores de bactérias e vírus, e ainda provocam infecções secundárias por fungos que podem levar à morte dos organismos infectados. Por tanto, a falta de informações leva à utilização de formulações de uso agrícola ou veterinário, sem especificações técnicas do fabricante para uso no setor aquícola (MABILIA et al., 2004).

O grande problema da utilização desses produtos químicos, tóxicos tanto nas lavouras quanto nas pisciculturas, está relacionado aos possíveis impactos negativos que podem provocar quando atingem, nos ambientes aquáticos, espécies sensíveis e não alvos (SOUZA, 2008).

2.3. Contaminação dos ambientes aquáticos por agrotóxicos

Além dos fatores naturais, as atividades humanas têm gerado grandes alterações nos ecossistemas aquáticos. Após a Segunda Guerra Mundial, durante a qual foram sintetizadas inúmeras substâncias químicas até então inexistentes, como os agrotóxicos, problemas relacionados à poluição das águas ficaram mais complexos (BADELLINO, 2006). O modelo de desenvolvimento humano tem se mostrado altamente impactante, principalmente devido à grande produção de resíduos e à introdução de compostos tóxicos na água (GUERESCHI, 2004).

A contaminação de sistemas aquáticos superficiais por agrotóxicos pode se dar das seguintes formas: aplicação direta no meio aquático para o controle de algas e invertebrados indesejáveis; lavagem de solo ou lixões contendo resíduos de produtos tóxicos; deriva, em que as gotículas ou partículas do produto são levadas pela corrente de ar; despejos de efluentes domésticos e industriais contaminados; chuvas contaminadas com resíduos voláteis de agrotóxicos; e escoamento superficial de áreas cultivadas, que é considerada a maior rota de entrada de agrotóxicos para o meio aquático (NINMO, 1985; DORES e DE LAMONICA-FREIRE, 1999; TOMITA e

BEYRUTH, 2002; ZAGATTO, 2006). Os agrotóxicos também podem atingir ecossistemas aquáticos subterrâneos (lençóis freáticos) por meio de percolação da água no solo (TOMITA e BEYRUTH, 2002; BRIGANTE et al., 2003). O potencial de um agrotóxico poluir reservatórios de água subterrânea depende de sua mobilidade no solo (LOURENCETTI et al., 2005), onde se o contaminante apresenta elevada pressão de vapor e baixa afinidade com os constituintes do solo, sofre rápida volatilização; contudo se é uma substância hidrossolúvel, pode ser lixiviada facilmente, atingindo águas subterrâneas ou aquíferos.

Dependendo das características fisicoquímicas, o resíduo do agrotóxico na água pode se ligar ao material em suspensão, depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser detoxificado ou acumulado. O material em suspensão pode ser encontrado na forma de partículas ou de gotículas (como óleo). Os contaminantes podem estar adsorvidos a estas gotículas ou partículas sólidas. Estas formas podem ser transportadas pela água por longas distâncias (AZEVEDO e CHASIN, 2003). Alguns agrotóxicos e/ou metabólitos também podem retornar à atmosfera por volatilização (TOMITA e BEYRUTH, 2002).

Atividades agrícolas desenvolvidas em áreas próximas a ambientes aquáticos têm causado preocupação pelo risco de contaminação decorrente das aplicações de agrotóxicos. O conhecimento da influência exercida por estas atividades sobre os recursos naturais é de fundamental importância para assegurar a qualidade da água (PESSOA, 2003) e, embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não pontuais de poluição da água, geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias (EDWIN, 1996).

2.4. O inseticida diflubenzuron

O inseticida diflubenzuron (DFB), comercializado com o nome de Dimilin[®], é um inseticida que pertence ao grupo da benzoilfenilureia. A composição química deste produto encontrada na embalagem do produto comercial (Dimilin[®]) é 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)ureia, apresentando 25% do princípio ativo diflubenzuron e 75% de ingredientes inertes.

O DFB atua como inibidor do crescimento dos insetos e parasitas, pois impede a ecdise ou muda, causando a morte dos organismos expostos (BURKA et al., 1997). É

usado na agricultura para o controle de insetos em culturas como a de milho, tomate, algodão, trigo e citros (USEPA, 1997; TOMLIN, 1997). Porém, vem sendo muito utilizado de forma ilegal nas pisciculturas brasileiras, por apresentar, segundo estudos, resultados satisfatórios no controle de ectoparasitas e por se acreditar que este produto tenha baixa toxicidade para peixes (FUJIMOTO et al., 1999).

Entretanto, apesar desta baixa toxicidade, o inseticida pode apresentar efeitos subletais nos mesmos. A exposição a concentrações de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de Dimilin[®] durante 14 dias (DFB) causou alterações hematológicas e histológicas nas brânquias e fígado de *Prochilodus lineatus* (BENZE, 2013). GOULART (2012) observou lesões histológicas e alterações morfométricas nos testículos de machos adultos de *Hyphessobrycon eques* expostos a concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg.L⁻¹ de Dimilin[®] durante 96 horas e 17 dias. Dessa forma, o uso indiscriminado deste pesticida na agricultura e na piscicultura, pode levar à contaminação dos ecossistemas aquáticos e comprometer a qualidade da água, colocando em risco a biota aquática (MADUENHO e MARTINEZ, 2008).

A concentração do produto à base de diflubenzuron comumente usada diretamente nos tanques é de 100 a 200g.1000m³ de água, o que corresponde a 0,1-0,2 mg.L⁻¹ (MARTINS, 2004). Banhos terapêuticos utilizando 2,0 mg.L⁻¹ de diflubenzuron em repetições com intervalos de tempo de 24h também foram utilizados, pois mostraram eficácia no controle de *Dolops carvalhoi* (SHALCH et al., 2005). Estudos com diferentes espécies de peixes para avaliar a toxicidade do diflubenzuron indicam que a sua concentração letal média para 96 h de exposição (CL_{50-96h}) é maior que 50 mg.L⁻¹ (FISHER e HALL, 1992; PELLI et al., 2008), o que caracteriza o produto como pouco tóxico para peixes.

Concentrações que variam entre 0,5 a 2 mg.L⁻¹ podem ser letais para populações zooplanctônicas, principalmente aquelas que apresentam exoesqueleto quitinoso, como as de invertebrados de água doce, crustáceos marinhos e estuarinos (SCHALCH, et al., 2005).

Estudos com diferentes espécies de peixes para a determinação da concentração letal média (CL₅₀) em 96h de diflubenzuron indicam que um dos metabólitos do diflubenzuron, a 4-cloroanilina (PCA), apresenta elevada toxicidade para peixes, sendo maior que a do próprio produto de origem (FISHER e HALL, 1992). A PCA foi

classificada como mutagênica e provavelmente carcinogênica aos humanos pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA, USEPA (1997).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) classificou o DFB como produto de uso restrito devido à falta de informações sobre os efeitos que pode causar em invertebrados aquáticos. Em relação a vertebrados aquáticos, como peixes, há poucas informações sobre os efeitos que este inseticida pode causar. Assim, avaliar as condições de saúde de peixes neotropicais frente a um agente potencialmente contaminante como o Dimilin[®] é importante para se avaliar o risco ambiental e, eventualmente, sugerir critérios para seu uso (MADUENHO, 2007).

2.5. Peixes como bioindicadores da qualidade da água

Os bioindicadores podem ser definidos como organismos ou sistemas biológicos que reagem a alterações ambientais com a modificação de suas funções vitais normais e/ou da sua composição química, refletindo o quadro ambiental vigente, ou, em outros termos, sinalizando um evento ou condição num sistema biológico ou amostra, que fornece uma medida de exposição, efeito ou susceptibilidade (AITIO, 2007).

A utilização de peixes como bioindicadores apresenta várias vantagens (FLOTEMERSCH et al., 2006), dentre as quais podem ser citadas:

- a utilização de espécies que representam variadas categorias tróficas e utilizam alimentos de origem terrestre e aquática;
- sua posição no topo da cadeia alimentar aquática, quando comparada com organismos de níveis tróficos mais baixos, que oferece uma visão integrada do corpo hídrico, pois são reflexo do que ocorre nesses níveis inferiores;
- podem estar presentes em comunidades aquáticas de todos os tamanhos, como arroios, pequenos e grandes rios, represas, lagoas e, inclusive, nos mares;
- são bons indicadores de efeitos em longo prazo e condições do habitat numa escala ampla, pois têm ciclos de vida mais longos que alguns outros organismos utilizados como bioindicadores, além de ocuparem o espaço numa escala bem maior que organismos menores; e
- os peixes vivem todo seu ciclo de vida na água, sendo integrantes da história física, química e biológica desse ambiente.

Quando peixes e outros organismos são expostos a ambientes muito degradados, os efeitos dos poluentes podem ser dramáticos e, no caso de poluição severa, pode haver mortalidade quase instantânea (BOTELHO, 2010). Longos períodos de exposição a ambientes menos degradados podem resultar na morte de alguns indivíduos dentro de uma população, ou ainda em prejuízos bastante visíveis. Por outro lado, a curta exposição pode resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (JOBILING, 1995).

Vários trabalhos fazem uso destes animais para avaliar o efeito do estresse causado por variações no ambiente aquático (OVERSTREET, 1988; TEH et al., 1997; GUNDERSEN et al., 2000; SCHWAIGER, 2001). Entretanto, ainda são poucos trabalhos com espécies neotropicais (SILVA FILHO, 2010; MORAES, 2011; NUNES, 2011; GOULART, 2012; MARCON, 2013 e LEANDRO, 2014).

2.6. Biomarcadores em peixes

O estresse químico pode alterar a capacidade do peixe de realizar várias funções fisiológicas que, uma vez caracterizadas, podem ser utilizadas como biomarcadores de poluição aquática (JOBILING, 1995). Os biomarcadores podem ser definidos, em termos ecotoxicológicos, como uma alteração numa resposta biológica (desde mudanças moleculares por meio de respostas celulares e fisiológicas, a mudanças comportamentais) que reflete os efeitos tóxicos de substâncias químicas dispersas no ambiente (ISLAS-FLORES et al., 2013).

Existem biomarcadores moleculares, celulares e em nível de indivíduo. As duas características mais importantes dos biomarcadores são: permitem identificar as interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos; e possibilitam a mensuração de efeitos subletais. Daí a importância e o interesse atual de incorporação da análise de biomarcadores em programas de avaliação da contaminação ambiental (JESUS e CARVALHO, 2008).

Segundo PEAKALL (1992) os biomarcadores podem ser classificados como:

a) biomarcadores de enzimas de biotransformação (indução vs. inibição das atividades das enzimas de biotransformação após exposição a um xenobiótico, tais como a glutatona S-transferase e UDP-glicuroniltransferase);

b) biomarcadores de alteração de proteínas reguladoras (como por exemplo, medição dos níveis de proteínas de estresse, como as metalotioneínas);

c) biomarcadores de disfunção endócrina e reprodutiva (por exemplo, avaliação dos níveis de estrogênio, anomalias no sistema reprodutor e capacidade de reprodução);

d) biomarcadores de genotoxicidade (análise de alterações em nível da estrutura do DNA) e imunotoxicidade como a concentração de imunoglobulinas;

e) biomarcadores histopatológicos (por exemplo, detecção de lesões teciduais ou necrose);

f) biomarcadores de metabolismo energético (teor de reservas lipídicas);

g) biomarcadores de neurotoxicidade (como por exemplo, a avaliação da atividade das colinesterases);

h) biomarcadores de estresse oxidativo (por exemplo, avaliação da atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase, glutatona redutase e glutatona peroxidase); e

i) biomarcadores comportamentais (como por exemplo, avaliação de categorias morfofuncionais de acordo com reações morfofisiológicas, como distúrbios respiratórios, distúrbios natatórios, distúrbios tegumentares e reprodutivos; dentre outros);

Dentro dos biomarcadores, grande destaque tem sido atribuído ao desenvolvimento de ensaios que visam a quantificação da atividade de enzimas que desempenham papel chave em processos fisiológicos comuns, como a neurotransmissão, a desintoxicação, a respiração ou a resposta anti-oxidante (OLIVEIRA, 2014).

As enzimas de biotransformação se destacam entre os biomarcadores mais sensíveis, cuja atividade nos organismos pode ser induzida ou inibida após a exposição a xenobióticos. A principal resposta do organismo perante um contaminante é a detoxificação, que visa transformar o xenobiótico do estado ativo para o estado inativo, facilitando sua eliminação. Esta via metabólica emprega uma grande variedade de enzimas e é normalmente dividida em três classes, denominadas de fase I, fase II e fase III. Dentre as principais enzimas envolvidas neste processo, destacam-se as da família do citocromo P450 (CYP), a glutatona-S-transferase (GST) e sulfotransferase (SULT).

As reações de fase I envolvem hidrólise, redução e oxidação do composto estranho. Já as reações de biotransformação de fase II incluem glucuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutatona (síntese de ácido

mercaptúrico), e conjugação com aminoácidos (como a glicina, taurina e ácido glutâmico) (KLAASSEN, 2001). Os cofactores para estas reações reagem com grupos funcionais que estão presentes nos xenobióticos ou que são introduzidos/expostos durante a fase I da biotransformação. Tanto alterações em nível de atividade das enzimas envolvidas nas reações de fase I como nas de fase II são frequentemente utilizadas como critérios de toxicidade em estudos ecotoxicológicos. Finalmente, as enzimas de fase III (por exemplo, peptidases, hidrolases e biliases) catalisam o catabolismo dos metabólitos conjugados, com o objetivo de formar produtos excretáveis (KLAASSEN, 2001).

Segundo BRANDÃO et al. (2011), a utilização de biomarcadores em estudos de ecotoxicologia apresenta várias vantagens, pois permitem observar antecipadamente a existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas; identificar espécies ou populações em risco de contaminação; analisar a magnitude da contaminação; prever o grau de severidade dos efeitos causados pelos poluentes; e estabelecer relações de causalidade entre espécies químicas e efeitos em vias metabólicas específicas que podem justificar respostas biológicas mais complexas, como alterações comportamentais e reprodutivas.

2.6.1. Histopatologia de peixes

A histopatologia é uma ferramenta que pode ser considerada como um excelente método de comprovação de danos em um nível de organização biológica superior aos moleculares e bioquímicos. Por isso, a histologia patológica é utilizada em análises do efeito de xenobióticos sobre biomonitorios (ALBINATI, 2009; TAGLIAFERRO, 2009; BORAN, 2010; NUNES, 2011; HUED, 2012; GOULART, 2012; LEANDRO, 2014; MARCON et al., 2014, 2015a, 2015b).

Alterações histológicas em tecidos de peixes são biomarcadores do efeito da exposição aos estressores do meio ambiente. As alterações histológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar à formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HINTON e LAURÉN, 1990; HINTON et al., 1992). Esta categoria de biomarcadores permite um exame específico dos órgãos e das células alvo, e como eles são afetados sob condições *in vivo*. Além disso, em avaliação de campo, a histopatologia é um método eficaz para detectar os

diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (HINTON et al., 1992).

Características histopatológicas são específicas de cada organismo e podem expressar as condições de vida do animal e representar o impacto causado no organismo pelo poluente. As mudanças histológicas são consideradas mais sensíveis que os parâmetros relacionados apenas com o crescimento ou reprodução do indivíduo (TEH et al., 1997). Para isso, a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos.

Os tecidos e órgãos mais utilizados para estudos histológicos em peixes são brânquias, tegumento, olhos, intestino, bexiga natatória, fígado, pâncreas, rim, baço e coração (SARAIVA, 2006). Órgãos de contato direto com o agente tóxico, como as brânquias e os órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos, como o fígado e o rim, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais.

As brânquias são o órgão de vital importância para peixes, sendo responsável por trocas gasosas, processo de osmorregulação, equilíbrio ácido básico, transporte e excreção de compostos nitrogenados e ainda função sensorial de degustação. Entretanto, sua vasta área de superfície, o íntimo contato com o meio externo e sua estrutura delicada fazem das brânquias um órgão chave para a ação de ectoparasitos e poluentes existentes no meio aquático. Assim, qualquer alteração nessa estrutura causará desequilíbrio orgânico comprometendo a sobrevivência e desempenho dos peixes (MORGAN; TOVELL, 1973; CAVICHILO, 2009).

2.7. O peixe mato grosso *Hyphessobrycon eques*

Hyphessobrycon eques (Figura 1) (Família: Characidae), conhecido popularmente como “Tetra Serpae” ou “Mato Grosso”, é um peixe sul americano, onívoro, que está entre as espécies de peixes ornamentais de águas continentais mais exportadas pelo Brasil, sendo assim uma espécie de valor econômico. Sua distribuição geográfica abrange a bacia dos rios Paraguai e Amazonas. Atualmente, esta espécie tem sido introduzida em muitas bacias do Brasil pela prática da piscicultura ornamental (ALVES et al., 2007), servindo como fonte de renda de muitas famílias que vivem da criação desse peixe. Destaca-se pela diversidade de formas, cores brilhantes,

comportamento pacífico e pelo seu pequeno porte, apresentando tamanho padrão de 32,0 mm podendo atingir no máximo 58,0 mm (GRAÇA E PAVANELLI, 2007).

São caracterizados por possuírem cor avermelhada; mancha umeral escura grande e transversalmente alongada; um ponto preto conspicuo dorsal salientado por uma zona branca, amarela ou vermelha; nadadeiras avermelhadas; nadadeira dorsal com mácula escura e nadadeira anal com extremidade escura; dois a três dentes no maxilar e no máximo seis na fileira interna do pré-maxilar (HEIN, 2008). Os machos costumam ser mais avermelhados, e na época da reprodução assumem uma acentuada mudança de cor. O dimorfismo sexual é bastante nítido, uma vez que o macho apresenta um pequeno prolongamento em forma de gancho na nadadeira anal.

É uma espécie de comportamento gregário, que se posiciona perto da superfície entre as hastes de plantas de emersão, sendo encontrados frequentemente em águas estagnadas. Alimentam-se de vermes, crustáceos, insetos e plantas. Seu modo reprodutivo é ovíparo. Esta espécie faz parte de um complexo de tetras “sanguíneos” híbridos produzidos facilmente, e que são oferecidos geralmente no comércio de aquários (WEITZMAN e PALMER, 1997).

Pela sua importância ecológica e econômica, por ser altamente sensível a diferentes substâncias e por mostrar fácil adaptação em laboratório para estudos ecotoxicológicos, o peixe *Hyphessobrycon eques* tem sido recentemente utilizado em testes de toxicidade de xenobióticos (NUNES, 2011; GOULART, 2012; AGUINAGA et al., 2014 e LEANDRO, 2014). No entanto, ainda são poucas as pesquisas realizadas até o momento empregando o *Hyphessobrycon eques* como bioindicador de contaminação aquática.



Figura 1. Exemplar de *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882)
Fonte: Aquaportail.com

2.8. Características gerais de brânquias dos peixes teleósteos

A maior parte dos teleósteos possui quatro pares de arcos branquiais situados a cada lado da cavidade bucal, e conectados pelo septo interbranquial. Os arcos branquiais possuem suporte de cartilagem hialina e tecido ósseo, variando de acordo com a fase de desenvolvimento, associados a uma camada transversal de tecido muscular liso (PROCÓPIO et al., 2008) e revestidos por epitélio mucoso que apresenta-se contínuo ao da faringe e ao da cavidade bucal. Destes arcos, partem uma fileira dupla de filamentos achatados dorsoventralmente que se subdividem em lamelas branquiais que se encontram dispostas perpendicularmente, sendo sua organização geral baseada em um sistema de subdivisões sucessivas (CAVICHIOLO, 2009).

As lamelas são constituídas centralmente por um eixo vascular e por um epitélio branquial estratificado, sendo constituído por diversos tipos celulares, em particular, por três: as células pavimentosas, que aparecem em maior frequência e possuem função de trocas gasosas; as células de cloreto, responsáveis pela regulação iônica, equilíbrio ácido base e excreção de metabólitos nitrogenados; e as células mucosas, responsáveis pela produção de muco, o qual possui função de lubrificação e bactericida (EVANS, 1987; EVANS et al., 2005; MONTEIRO et al., 2004).

As brânquias desempenham um papel vital para os peixes, ocupando o primeiro lugar entre os órgãos envolvidos na manutenção da saúde e metabolização de nutrientes, parâmetros fundamentais para o bom desenvolvimento destes animais. São órgãos multifuncionais, que desempenham um grande número de funções, como a troca de gases (O_2/CO_2), a regulação iônica e osmótica, e o equilíbrio ácido base, os quais são continuamente ajustados em função de oscilações internas e externas de pH, íons dissolvidos e a excreção de produtos nitrogenados (LAURENT e PERRY, 1991; FERNANDES e PERNA-MARTINS, 2001; MORON et al., 2003). Esse órgão possui extensa superfície que está em contato direto com o ambiente aquático sendo, portanto, particularmente sensível à presença de contaminantes no meio e considerado como o primeiro órgão alvo da maior parte dos poluentes, e o primeiro a reagir às condições desfavoráveis de um ambiente (WONG e WONG, 2000; MAZON et al., 2002).

Na presença de poluentes, 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 de superfície em

contato com o poluente (CAVICHIOLO, 2009). Por isso, as alterações morfológicas nas brânquias podem representar estratégias adaptativas para a conservação de algumas funções biológicas quando o animal enfrenta mudanças ambientais (BENZE, 2013).

Os efeitos dos poluentes sobre a estrutura branquial vêm sendo muito estudados em peixes coletados em ambientes poluídos ou expostos a testes em laboratório, e as alterações histológicas encontradas vêm sendo utilizadas como um indicador sensível da contaminação aquática (SCHWAIGER, et al., 1997; COUTINHO e GOKHALE, 2000; MORAES, 2011; BENZE et al., 2014; SOUSA, 2014).

As alterações mais comuns encontradas nas brânquias de peixes expostos a xenobióticos são elevação do epitélio lamelar, hiperplasia, proliferação das células do epitélio filamentar, fusão parcial e total das lamelas branquiais, vasodilatação, aneurismas lamelares e necrose (BORAN et al., 2010; MORAES, 2011; SHIOGIRI et al., 2012; BARJA-FERNÁNDEZ et al., 2013; BENZE et al., 2014; SOUSA, 2014). As alterações histológicas nas brânquias são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados nos peixes pela exposição a diferentes contaminantes (ARELLANO et al., 1999). Assim, um bom conhecimento básico de sua estrutura histológica é de extrema importância no diagnóstico clínico, uma vez que alterações estruturais em seu epitélio são ótimos indicativos antecipados de problemas ocasionados pelo ambiente onde o peixe está inserido, bem como de instalação de processos infecciosos (CAVICHIOLO, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Discriminar a possível influência do sexo dos peixes em resposta à ação do inseticida Dimilin[®], e investigar os possíveis efeitos tóxicos deste inseticida sobre as características morfológicas das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques* após exposição a diferentes concentrações.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar se a exposição subletal ao Dimilin[®] causa alterações morfológicas no tecido branquial e qual o grau de comprometimento da função das brânquias;

- Avaliar as possíveis alterações histológicas e morfométricas nas brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*, após exposição ao inseticida Dimilin[®], comparando-as com os animais do grupo controle; e

- Determinar se as brânquias de machos e fêmeas de *H. eques* reagem de maneira diferente à exposição subletal ao Dimilin[®].

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Normas de conduta para uso de animais na pesquisa

Todos os procedimentos foram realizados seguindo as Normas de Conduta da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (Protocolo n. 56/2013). O médico veterinário responsável pela coordenação e orientação do estudo foi o professor Laércio dos Anjos Benjamin (CRMV-MG 3387).

4.2. Animais

Foram utilizados 160 exemplares da espécie *Hyphessobrycon eques*, coletados no mês de outubro na Piscicultura da Prata, Eugenópolis/Minas Gerais, (21°05'55''S 42° 11'13''W), na bacia do rio Paraíba do Sul, e transportados para o Laboratório de Peixes do Departamento de Veterinária da UFV. Os animais possuíam tamanhos aparentemente semelhantes. A sexagem baseou-se na morfologia externa do animal, como formato do corpo (mais esguio nos machos) e coloração (cores mais intensas nos machos). Os peixes passaram por um período de aclimação durante 15 dias em aquários de 50 L, com sistema de filtração com bombas e aeração contínua da água, fotoperíodo de 12 h, com troca diária de 10% do volume da água do aquário, com o propósito de eliminar restos de matéria orgânica, sendo imediatamente substituída, mantendo-se as mesmas características iniciais. A temperatura foi controlada entre 25±1°C por meio de termostatos e termômetros e aferida duas vezes ao dia. Durante a aclimação, os peixes receberam alimentação diária “ad libitum” ou até aparente saciedade, com ração comercial contendo 28% de proteína bruta.

4.3. Análise de água

A qualidade da água foi avaliada antes e após a aplicação do inseticida, utilizando-se amostras para análises de parâmetros físicoquímicos. Ao término dos experimentos, as amostras de água coletadas para análise consistiram de um pool dos três aquários que constituíam cada repetição. As análises foram feitas na Divisão de Água e Esgoto do departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Os parâmetros avaliados foram pH (modelo pHmetro DN21, Digimed, São Paulo), dureza (titulação), oxigênio dissolvido (OD) (titulação iodométrica), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), turbidez (turbidímetro modelo 2100AN, Hach, São Paulo) e cloro livre (kit colorimétrico DPD L-1, Hach, São Paulo), de acordo com os procedimentos dispostos no Standard Methods (EATON et al., 2005). A amônia foi monitorada diariamente no laboratório, juntamente com a temperatura, utilizando um kit de teste para aquário modelo Labcon test (Alcon Ltda, Camboriú, SC).

Os parâmetros indicadores da qualidade da água utilizada para realização do experimento foram aferidos para garantir que estas alterações não ocasionassem a mortalidade ou mesmo alterações na toxicidade do produto sobre as brânquias. A água foi mantida em condições adequadas para os peixes ao longo dos períodos experimentais. A escolha do uso de água tratada para consumo humano, livre de cloro, mantida em caixa d'água de 1000L mostrou-se adequada. A manutenção dessa água durante 10 dias, com aeração contínua, antes da aclimatação dos animais nos aquários visou reduzir o cloro residual, controlar a temperatura e estabilizar os demais parâmetros físicoquímicos.

4.4. Desenho experimental

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

Inicialmente foi conduzido um experimento com duração de 96 h, utilizando concentrações de 0,01; 0,1; e 1,0 mg.L⁻¹ de Dimilin[®], inferiores à CL₅₀-96h calculada

para a espécie, que foi de 22,4 mg.L⁻¹ (GOULART, 2012), simulando as concentrações utilizadas nos tratamentos de ectoparasitos adotados por pisciculturas (MABÍLIA e SOUZA, 2006), e um grupo controle. Para cada concentração, mais o grupo controle, foram utilizadas três repetições, totalizando 4 aquários de 50L, com 10 peixes por aquário, com um total de 40 peixes utilizados para cada sexo. Seguindo-se as recomendações para realização de testes de toxicidade aguda, os peixes não foram alimentados durante o período de exposição (ABNT, 2006).

Posteriormente, foi realizado um experimento com duração de 17 dias, simulando as condições de tratamento nas pisciculturas. Foram utilizadas as mesmas concentrações do teste de 96 h, sendo utilizadas três repetições para cada concentração, num total de 4 aquários de 50 L, com 10 peixes por aquário, com um total de 40 peixes utilizados para cada sexo. Foram realizadas duas aplicações do Dimilin[®] por aquário, com as aplicações sendo realizadas no primeiro e quarto dia do experimento (MABÍLIA et al., 2004). Os peixes foram alimentados normalmente duas vezes ao dia, como ocorre nas pisciculturas.

4.5. Obtenção dos dados biométricos

Ao final dos períodos de exposição ao Dimilin[®], os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína 1:10.000 e eutanasiados por aprofundamento da anestesia seguida de secção na transição cabeça-corpo, de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, <http://www.cobea.org.br>). Após a eutanásia, foram obtidos o peso corporal, as medidas do comprimento total e padrão, e coleta das brânquias para estudo histológico.

4.6. Coleta de amostras e processamento para estudo histológico

Os estudos histológicos foram conduzidos em dez animais por concentração. Para a histologia das brânquias foram utilizados fragmentos do segundo arco braquial. Os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2 durante 24 h. Em seguida, as brânquias foram lavadas e mantidas em álcool 70% para preservação. Após esse processo, os fragmentos foram pré-infiltrados em solução de resina:álcool 1:1, por 12 h, em temperatura ambiente, seguido de infiltração em resina pura por 24 h, e emblocamento em resina metacrilato.

Os fragmentos foram seccionados em cortes semisseriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático Leica RM2155 com navalha de vidro e utilizados para as contagens celulares e descrição das características morfológicas observadas no grupo controle e nos grupos tratados. Para cada animal, foi confeccionada uma lâmina com 9 cortes. Os cortes foram submetidos à técnica de coloração com Hematoxilina-Eosina para posterior análise microscópica. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck). Os cortes foram analisados em fotomicroscópio Nikon Eclipse E600 (Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do Bioagro/UFV) e as imagens digitais foram capturadas por meio de câmera Feldmann Wild Leitz, FWL DIGI-PRO 50M em objetiva de 10X e 40X.

4.7. Análises histológicas

A análise histológica constituiu-se basicamente de duas etapas: análise histopatológica e análise morfométrica. Os estudos histológicos foram conduzidos em dez animais por concentração. As lâminas histológicas foram analisadas em toda sua extensão e fotografadas (ocular de 10X e objetiva de 40X) em 10 campos ao acaso para análises histopatológicas e morfométricas que pudessem ser representativas dos efeitos do Dimilin[®] no tecido branquial. Estas alterações foram comparadas com o padrão de organização das brânquias das lâminas do grupo controle.

As alterações histológicas foram avaliadas semiquantitativamente de duas formas: a) Cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com SCHWAIGER et al. (1997). Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão); e b) Cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IHA), com base na severidade de cada lesão. As lesões encontradas no tecido branquial foram classificadas de acordo com POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC (1994) em quatro grupos (G) (Tabela 2), conforme o tipo e localização do dano: G1, hipertrofia e hiperplasia do epitélio branquial; G2, alterações nas células de cloreto e de muco; G3, alterações nos vasos sanguíneos; e G4, necrose e fibrose. Elas também foram classificadas em três estágios (S) progressivos com base na gravidade das lesões e na possibilidade da recuperação: SI, alterações consideradas leves, que não

alteram a função do tecido; SII, alterações moderadas, que alteram parcialmente a função do tecido; e SIII, alterações severas, que alteram totalmente a função do tecido. Para o cálculo do IAH foi usada a seguinte equação proposta por POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC (1994): $IAH = 10^0 \cdot \sum SI + 10^1 \cdot \sum SII + 10^2 \cdot \sum SIII$, onde SI, SII e SIII correspondem ao número de alterações de estádios I, II e III, respectivamente. O valor do IAH foi calculado para cada animal pela soma do número de tipos de lesão de cada uma das três fases multiplicado pelo índice de fase. Os valores do IAH foram classificados em quatro categorias: 0-10 = funcionamento normal do órgão; 11-20 = alterações leves; 21-50 = alterações moderadas; 51-100 = lesões severas e >100 = alterações irreversíveis no órgão. Os resultados do IAH foram expressos em médias \pm desvio padrão.

Tabela 2. Classificação das alterações histopatológicas das brânquias quanto ao tipo e localização das lesões e dos estágios em que se inserem de acordo com POLEKSIC E MITROVIC-TUTUNDZIC (1994).

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS BRANQUIAIS	ESTÁDIO
G1. Hipertrofia e hiperplasia do epitélio branquial	
Hipertrofia do epitélio lamelar	I
Elevação do epitélio lamelar	I
Hiperplasia do epitélio lamelar	I
Desarranjo lamelar	I
Fusão incompleta das lamelas	I
Fusão completa de algumas lamelas	I
Fusão completa de várias lamelas	II
G2. Alterações nas células de cloreto e mucosas	
Proliferação das células de cloreto	I
Proliferação das células de muco	I
G3. Alterações nos vasos sanguíneos	
Dilatação do seio sanguíneo	I
Constricção do seio sanguíneo	I
Congestão vascular	I
Hemorragias com ruptura do epitélio	II
Aneurisma lamelar	II
G4. Estágio terminal	
Necrose	III
Fibrose	III

As análises morfométricas foram realizadas utilizando-se 10 filamentos branquiais, obtendo-se medidas da espessura das lamelas primárias, diâmetro dos vasos sanguíneos e comprimento das lamelas secundárias em três regiões distintas (base, meio e ápice) para cada peixe (Figura 2). As medidas foram obtidas utilizando o programa Image-Pro Plus 4.5. Nos mesmos 10 filamentos, com objetiva de 40X, foram fotografados 10 campos ao acaso por peixe, em cada grupo, para a quantificação de células de muco e de cloreto e dos focos de hemorragias.

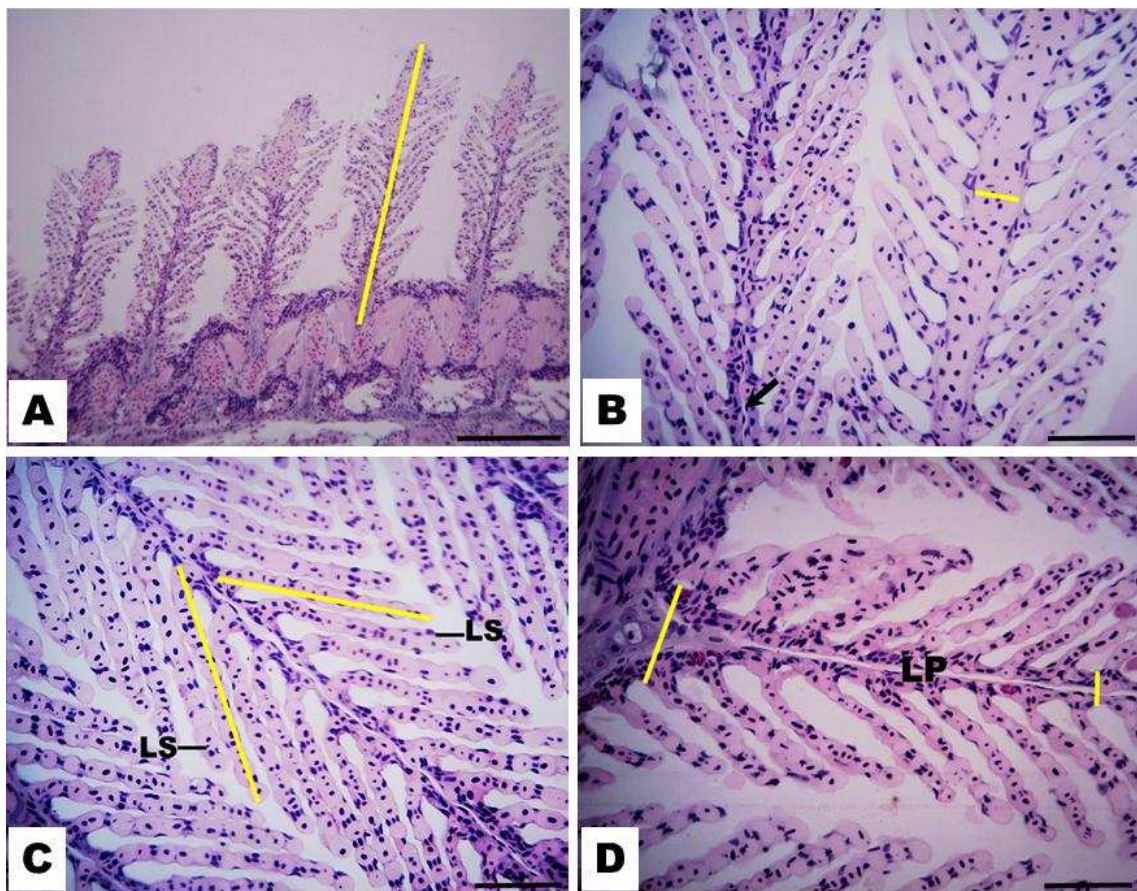


Figura 2. Fotomicrografias das brânquias de *H. eques* submetidos ao teste de efeito subletal do Dimilin® demonstrando a metodologia de mensuração das estruturas estudadas: Linhas amarelas indicam **A:** comprimento das lamelas primárias; **B:** diâmetro dos vasos sanguíneos (três regiões: base, terço médio e ápice) e seta (preta) indicando o lume do vaso; **C:** comprimento das lamelas secundárias (três regiões: base, terço médio e ápice); e **D:** espessura da lamela primária (três regiões: base, terço médio e ápice). **Coloração:** Hematoxilina-Eosina. **Barras:** 100 µm (A); 50 µm (B, C e D).

4.8. Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levenes) e, posteriormente, à análise de variância. Logo após, foi realizado o teste paramétrico de Duncan ou Tukey ($P < 0,05$) para comparar os valores médios nas diferentes concentrações dentro do mesmo experimento (96 h e 17 dias) separadamente para cada sexo. Para comparar os valores médios de cada concentração separadamente dentro dos experimentos de 96 h e 17 dias entre os sexos, as variáveis foram submetidas ao teste t de Student (Basic Statistics). 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 (ANOVA). Foi utilizado o programa Statistica 7.0 (Statsoft, EUA, 2009), com grau de significância de $P < 0,05$. Os gráficos foram produzidos usando o software Microsoft Excel 2013.

5. RESULTADOS

5.1. Análise de água

As tabelas 3 e 4 mostram que os parâmetros de qualidade de água mensurados durante o experimento.

Tabela 3. Parâmetros físicoquímicos da água no teste de toxicidade de 96 h do Dimilin® para H. eques.

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

ND- Não detectado

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

(**) CASAL (2010) (***) SWANN (2008)

Tabela 4. Parâmetros físicoquímicos da água no teste de toxicidade de 17 dias do Dimilin[®] para H. eques.

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

ND- Não detectado

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

(**) CASAL (2010) (***) SWANN (2008)

5.2. Dados biométricos

As tabelas 5 e 6 apresentam as médias de peso, comprimento total e comprimento padrão de machos e fêmeas após 96 h e 17 dias de exposição ao tóxico.

Tabela 5. Valores médios de comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e peso corporal (g) de H. eques em cada grupo experimental exposto ao Dimilin[®] por 96 h.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Comprimento total	Comprimento padrão	Peso corporal
0	33,23±0,48	27,9±0,39	0,54±0,24
0,01	34,21±0,70	29,01±0,59	0,57±0,19
0,1	35,57±0,26	20,64±0,22	0,63±0,14
1,0	37,28±0,35	30,77±0,31	0,66±0,11

Valores expressos como média ± desvio padrão. N=10.

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

Tabela 6. Valores médios de comprimento total (mm), comprimento padrão (mm) e peso corporal (g) de *H. eques* em cada grupo experimental exposto ao Dimilin[®] por 17 dias.

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

Valores expressos como média ± desvio padrão. N=10.

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

Machos e fêmeas apresentaram valores semelhantes para comprimento total, comprimento padrão e peso corporal, não havendo, portanto, diferenças entre sexos para esses padrões avaliados.

5.3. Análises morfológicas

As brânquias de *H. eques* (Figura 3A e B), como a maioria dos teleósteos, possuem quatro pares de arcos branquiais a cada lado da faringe que estão conectados pelo septo interbranquial. Dos arcos branquiais, que são sustentados por cartilagem hialina e tecido ósseo, partem duas fileiras de filamentos branquiais alternados entre si, os quais se subdividem em lamelas primárias e secundárias. Entre a junção dos filamentos branquiais com o arco branquial encontram-se as artérias branquiais, as quais se ramificam em lamelas secundárias, formando um eixo vascular central em cada uma delas. As lamelas primárias possuem um epitélio branquial estratificado, constituído por diferentes tipos celulares, como as células pavimentosas (epitélio respiratório) que recobrem as células pilares; as células de cloreto, localizadas próximas à base entre as lamelas primárias, são células maiores quando comparadas às demais, globosas e com núcleo central; e, por fim, as células de muco, encontradas nas bordas externas e internas do filamento branquial (Figura 4).

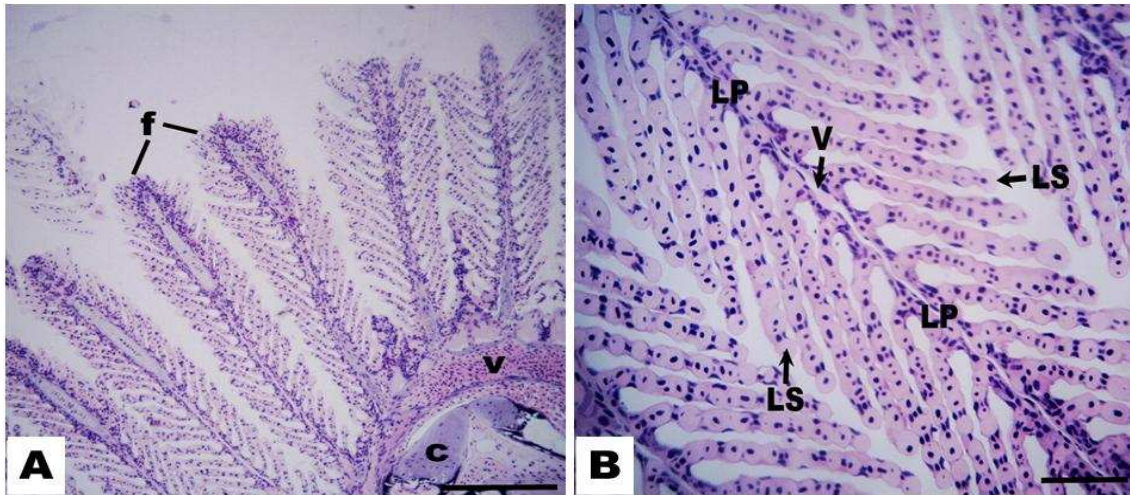


Figura 3. Corte longitudinal de brânquias de *H. eques* mostrando morfologia normal. **A:** Cartilagem (c), vaso sanguíneo (v) e filamentos branquiais (f); **B:** Lamelas primárias (LP), lamelas secundárias (LS) e vaso sanguíneo (V). **Coloração:** Hematoxilina-Eosina. **Barras:** 100 µm (A); 50 µm (B).

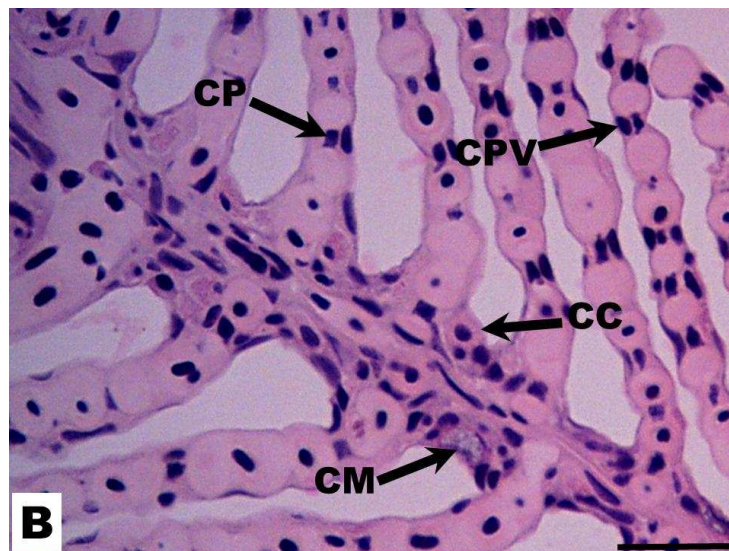


Figura 4: Corte longitudinal da brânquia de *Hyphessobrycon eques*. Célula de cloreto (CL); célula de muco (CM); célula pilar (CP) e célula pavimentosa (CPV). **Coloração:** Hematoxilina-Eosina. Barra: 50 µm.

5.3.1. Análises histopatológicas

No presente estudo, alterações histopatológicas nas brânquias de *H. eques* expostos ao Dimilin® foram observadas em peixes de todos os grupos experimentais em ambos os sexos. Verificou-se a ocorrência de hiperplasia, fusão lamelar, congestão vascular, desarranjo lamelar secundário, dilatação do eixo vascular (vasodilatação), hemorragias e elevação do epitélio lamelar (Figuras 5 e 6).

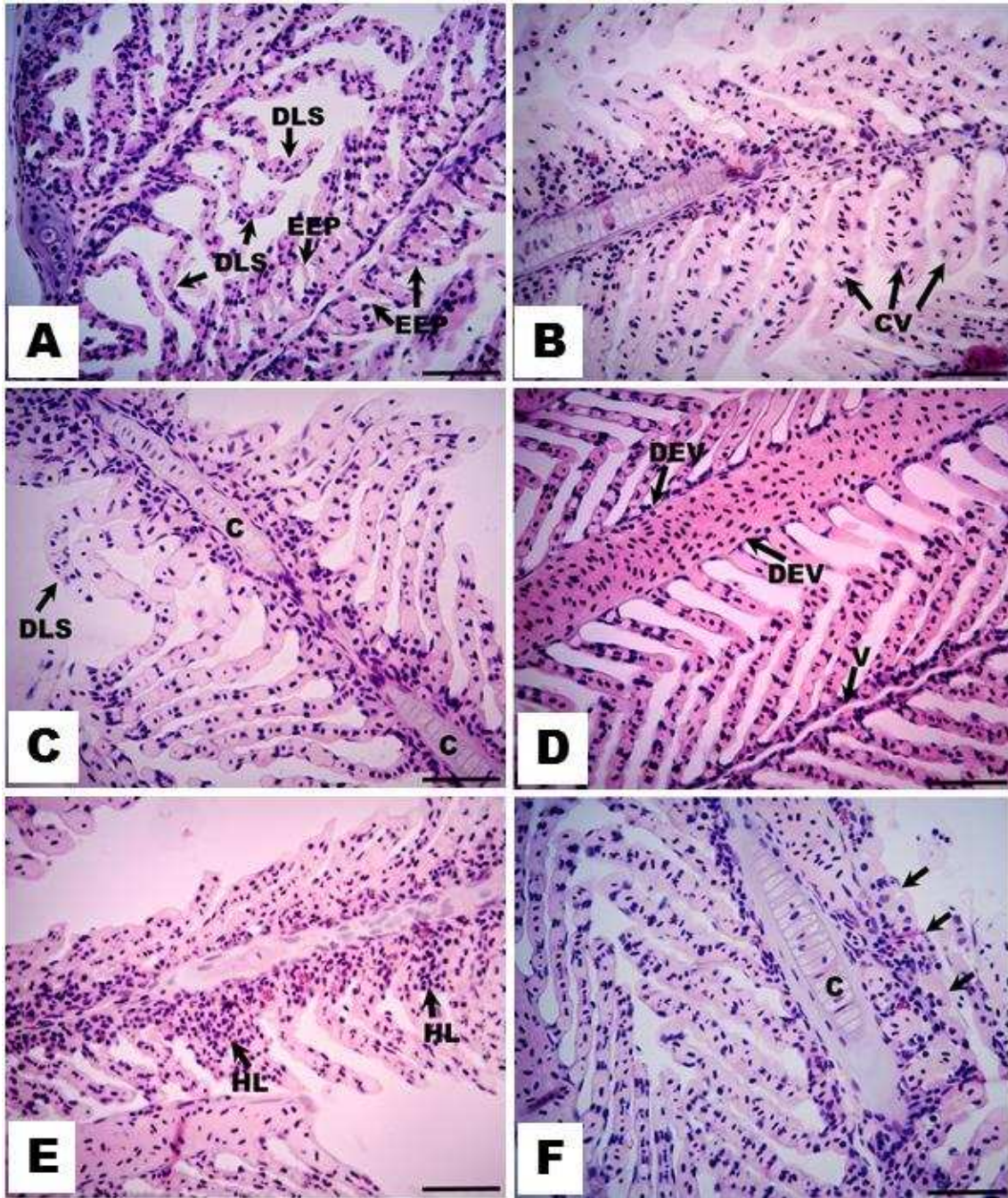


Figura 5. Alterações histopatológicas mais frequentes nas brânquias de machos e fêmeas de *H. eques* expostos a concentrações subletais de Dimilin® (0,01, 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) durante 96 h e 17 dias. **A:** elevação do epitélio lamelar (**EEP**) e desarranjo da estrutura lamelar secundária (**DLS**); **B:** congestão vascular (**CV**); **C:** desarranjo da estrutura lamelar secundária (**DLS**). Observe a presença da cartilagem hialina; **D:** dilatação do eixo vascular (**DEV**). **E:** hiperplasia do epitélio lamelar (**HL**); **F:** fusão completa de algumas lamelas (**setas**) e cartilagem (**C**). **Coloração:** Hematoxilina-Eosina. **Barra:** 50 µm.

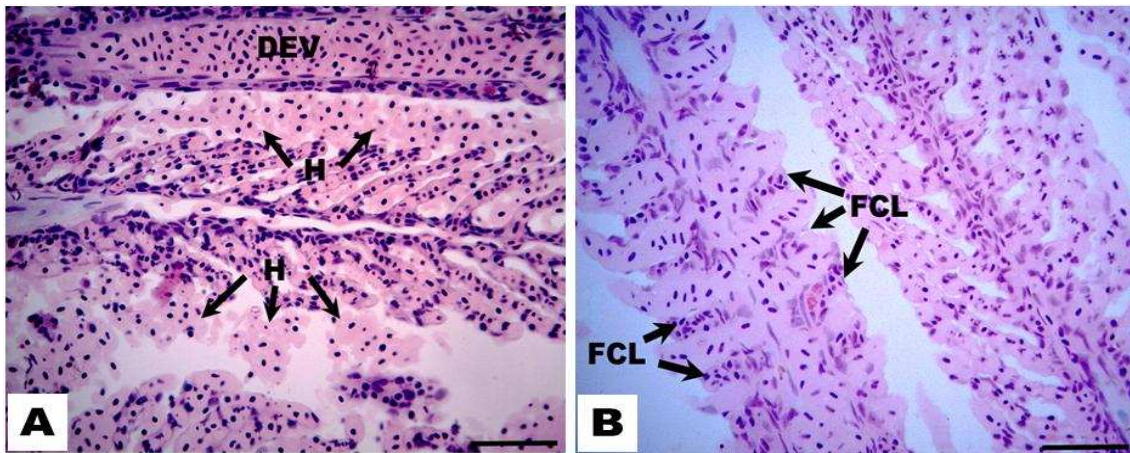


Figura 6. Alterações histopatológicas mais frequentes nas brânquias de machos e fêmeas de *H. eques* expostos a concentrações subletais de Dimilin® (0,01, 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) durante 96 h e 17 dias. **A:** dilatação do eixo vascular (DEV) e focos de hemorragia (H); **B:** Fusão completa de todas as lamelas (FCL). **Coloração:** Hematoxilina-Eosina. Barra: 50 µm.

As alterações patológicas de estágio I, como hiperplasia, hipertrofia do epitélio respiratório, desarranjo lamelar secundário, dilatação do eixo vascular e elevação do epitélio respiratório foram encontradas em todos os grupos tratados de ambos experimentos (96 h e 17 dias) em ambos os sexos. Dilatação do eixo vascular e congestão vascular foram as alterações encontradas com maior frequência. Entre as alterações de estágio II, fusões lamelares foram encontradas em machos e fêmeas de todos os grupos tratados. Fusão incompleta das lamelas foi observada com maior frequência nos grupos de ambos os sexos. Hemorragias foram encontradas com frequência em fêmeas na concentração 0,01 mg.L⁻¹ do experimento de 96 h e nas concentrações 0,01 e 1,0 mg.L⁻¹ do experimento de 17 dias. Em machos, foram observados poucos sinais de hemorragias nos animais de ambos os experimentos.

As alterações branquiais observadas neste trabalho foram classificadas quanto à sua distribuição, ao seu grau de severidade e ao comprometimento da função tecidual, resultando valores de IAH (índice de alteração histopatológica) (Figuras 7 e 8) e VMA (valor médio de alteração) (Figuras 9 e 10).

O IAH de fêmeas no experimento de 96 h foi diferente ($P < 0,05$) nos grupos expostos a 1,0 mg.L⁻¹ em comparação com o grupo controle, enquanto no experimento de 17 dias, diferenças foram observadas nos grupos tratados com 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ quando comparados com o grupo controle. Os valores de IAH foram significativamente maiores ($P < 0,05$) nos grupos expostos a 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ quando comparados com os animais expostos a 0,01 mg.L⁻¹ de Dimilin® dentro do experimento de 17 dias. Já em

machos, os valores de IAH mostraram diferenças ($P < 0,05$) nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg.L^{-1} , nos experimentos de 96 h e 17 dias, quando comparados com o controle. Quando comparados os valores do IAH entre os sexos, não houve diferença ($P > 0,05$) em nenhum dos experimentos.

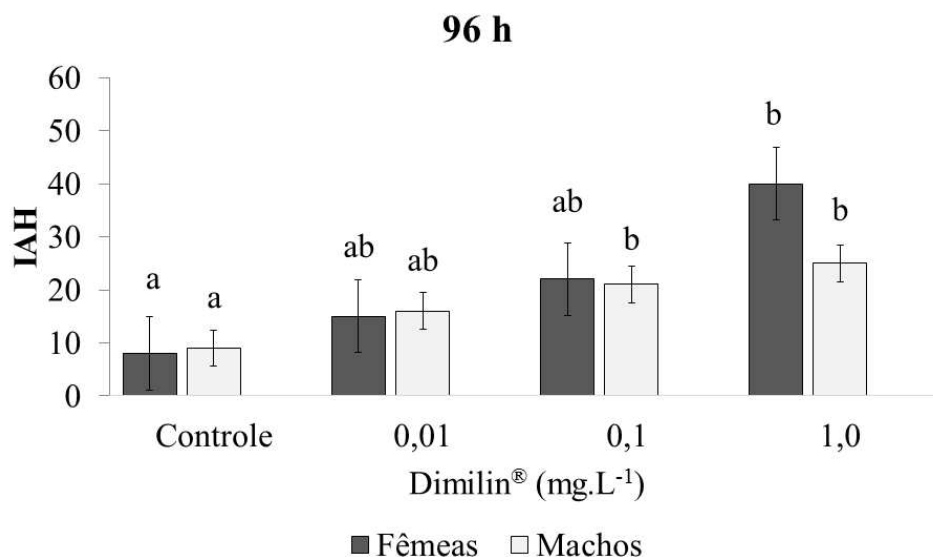


Figura 7. Índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques* após exposição a diferentes concentrações do Dimilin[®] durante 96 h. A linha vertical indica desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos do mesmo sexo ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença estatística entre os sexos na mesma concentração ($P < 0,05$). Teste de Tukey.

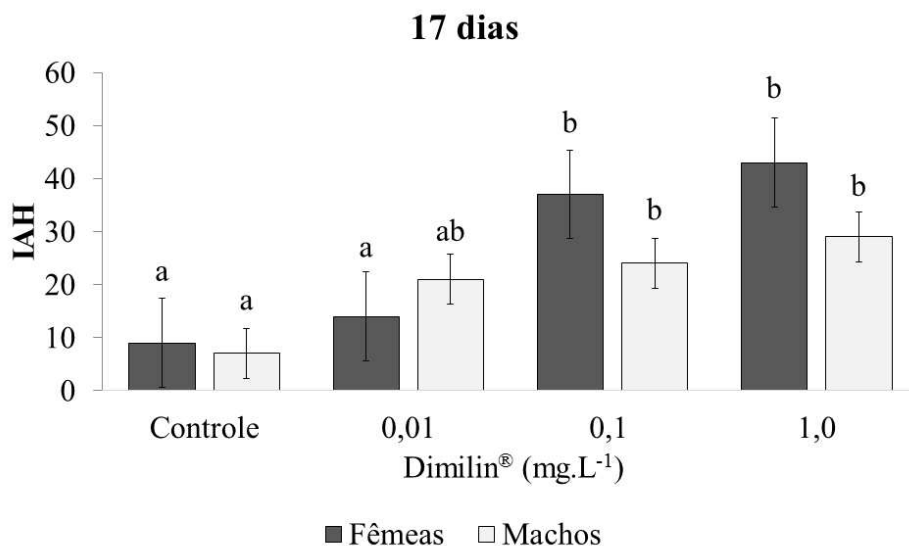


Figura 8. Índice de alteração histopatológica (IAH) das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques* após exposição a diferentes concentrações do Dimilin[®] durante 17 dias. A linha vertical indica desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos do mesmo sexo ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença estatística entre os sexos na mesma concentração ($P < 0,05$). Teste de Tukey.

O valor do IAH permaneceu entre a escala de 11 a 20 para os peixes fêmeas expostos a 0,01 mg.L⁻¹ de Dimilin® durante 96 h e 17 dias e para os peixes machos das mesmas concentrações no experimento de 96 h. Nos demais grupos, tanto em machos quanto em fêmeas, os valores de IAH registrados estiveram na escala de 21 a 50.

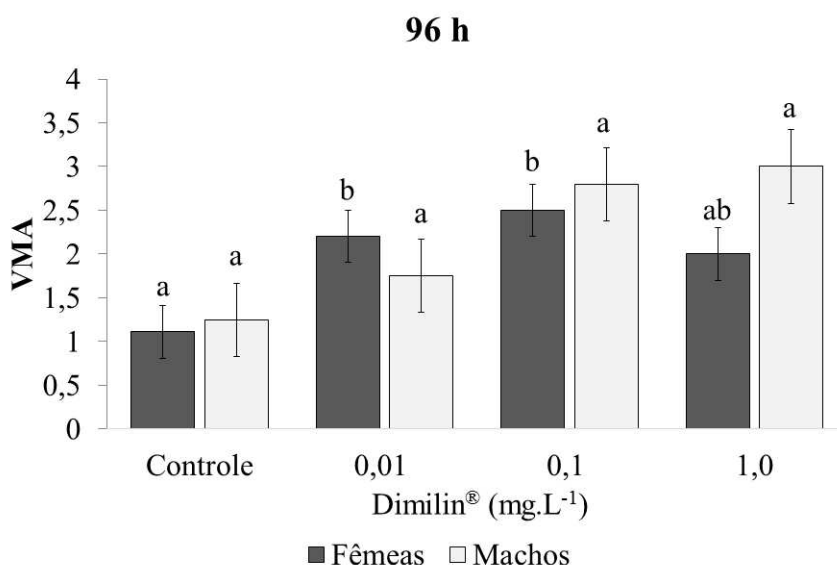


Figura 9. Valor médio de alteração (VMA) em brânquias de machos e fêmeas de *H. eques* após exposição a diferentes concentrações do Dimilin® durante 96 h. A linha vertical indica desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos do mesmo sexo ($P < 0,05$). Teste de Kruskal-Wallis.

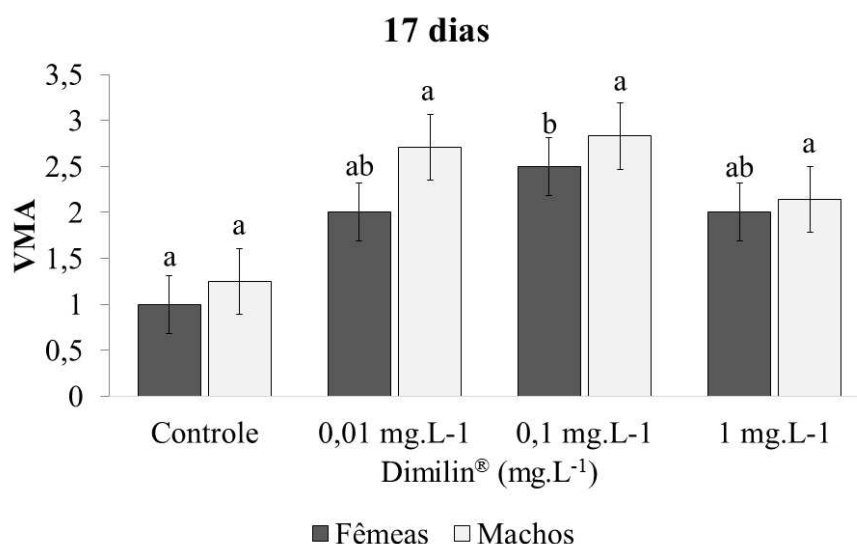


Figura 10. Valor médio de alteração (VMA) determinado para brânquia de machos e fêmeas de *H. eques* após exposição a diferentes concentrações do Dimilin® durante 17 dias. A linha vertical indica desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos do mesmo sexo ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença estatística entre os sexos na mesma concentração ($P < 0,05$). Teste de Kruskal-Wallis.

O VMA em fêmeas foi diferente ($P < 0,05$) na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ em comparação com o controle no experimento de 96 h. Em machos, diferenças ($P < 0,05$) foram observadas na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no experimento de 96 h e na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ no experimento de 17 dias, quando comparados com o grupo controle. Quando comparados os VMAs entre os sexos, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) em nenhum experimento. O VMA permaneceu de maneira geral na escala grau II.

5.3.2. Análises morfométricas

5.3.2.1. Sistema vascular

Os valores obtidos para o diâmetro do vaso nas lamelas primárias mostraram diferenças ($P < 0,05$) na região apical em todos os grupos tratados em comparação ao grupo controle no tempo de exposição de 96 h (Tabela 9), enquanto no experimento de 17 dias, diferenças ($P < 0,05$) foram observadas na base e no ápice em todos os grupos tratados em relação ao controle (Tabelas 7 e 9).

Em machos, no experimento de 96 h, a espessura do vaso mostrou diferenças ($P < 0,05$) na região basal em todas as concentrações quando comparados com o grupo controle (Figura 7). No terço médio, diferenças ($P < 0,05$) foram observadas na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ na comparação com o controle (Tabela 8). Já no ápice, houve diferença ($P < 0,05$) em todos os grupos expostos a Dimilin[®] (Tabela 9). No experimento de 17 dias, diferenças foram observadas ($P < 0,05$) na região basal, em todas as concentrações quando comparados com o controle (Tabela 7). No terço médio, houve diferença ($P < 0,05$) na concentração de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 8), enquanto no ápice, diferenças foram observadas ($P < 0,05$) em todas as concentrações quando comparadas com o grupo controle (Tabela 9).

Quando comparado o diâmetro do vaso entre os sexos, machos da concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ do experimento de 96 h apresentaram espessura do vaso na região basal significativamente maior ($P < 0,05$) em relação às fêmeas do mesmo grupo (Tabela 7). No experimento de 17 dias, machos apresentaram valores superiores ($P < 0,05$) para o diâmetro do vaso na base, nos grupos expostos a $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de Dimilin[®] (Tabela 7), e no terço médio, nos grupos expostos a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 8).

Tabela 7. Diâmetro (μm) do sistema vascular na base das lamelas primárias das brânquias de machos e fêmeas de H. eques.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	$7,43 \pm 3,50^a$	$7,00 \pm 3,40^a$	$6,32 \pm 3,43^a$	$5,20 \pm 1,44^a$
0,01	$25,98 \pm 12,61^b$	$13,00 \pm 9,02^a$	$21,90 \pm 13,99^{b*}$	$10,60 \pm 8,50^{b*}$
0,1	$20,04 \pm 14,90^b$	$15,50 \pm 12,05^a$	$24,10 \pm 16,63^b$	$14,40 \pm 10,71^b$
1,0	$19,10 \pm 12,30^{b*}$	$9,13 \pm 5,90^{a*}$	$20,85 \pm 13,26^b$	$14,80 \pm 10,20^b$

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

Tabela 8. Diâmetro (μm) do sistema vascular no terço médio das lamelas primárias das brânquias de machos e fêmeas de H. eques.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	$3,74 \pm 2,00^a$	$3,60 \pm 1,00^a$	$4,32 \pm 3,36^a$	$4,00 \pm 1,00^a$
0,01	$3,70 \pm 1,00^a$	$5,60 \pm 5,71^a$	$4,60 \pm 6,06^a$	$5,10 \pm 3,64^a$
0,1	$7,93 \pm 8,75^a$	$5,00 \pm 4,60^a$	$11,80 \pm 14,60^{b*}$	$4,54 \pm 5,30^{a*}$
1,0	$11,89 \pm 14,35^b$	$5,10 \pm 3,40^a$	$8,14 \pm 12,30^{ab}$	$6,72 \pm 9,93^a$

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

Tabela 9. Diâmetro (μm) do sistema vascular no ápice das lamelas primárias das brânquias de machos e fêmeas de H. eques.

Grupo(mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	$11,63 \pm 3,60^a$	$8,99 \pm 3,30^a$	$9,71 \pm 2,70^a$	$8,05 \pm 2,04^a$
0,01	$30,24 \pm 7,95^b$	$19,20 \pm 6,63^b$	$31,91 \pm 11,97^b$	$18,60 \pm 5,75^b$
0,1	$27,23 \pm 9,91^b$	$17,70 \pm 5,20^b$	$32,40 \pm 9,64^b$	$22,11 \pm 9,91^b$
1,0	$26,34 \pm 11,73^b$	$24,06 \pm 7,63^b$	$29,60 \pm 11,60^b$	$24,35 \pm 7,74^b$

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

5.3.2.2. Espessura do epitélio lamelar primário

Na espessura das lamelas primárias em fêmeas na região da base, terço médio e ápice houve diferenças ($P < 0,05$) em todos os grupos tratados dos experimentos de 96 h e de 17 dias quando comparados com grupo controle (Tabelas 10, 11 e 12).

Nos indivíduos machos, no experimento de 96 h, diferenças ($P < 0,05$) em relação ao controle foram observadas em todas as concentrações para espessura da lamela primária na base (Tabela 10), e nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ na região apical (Tabela 12). Já no experimento de 17 dias, diferenças ($P < 0,05$) foram observadas em todas as concentrações na região basal da lamela (Tabela 10), nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg.L⁻¹ no terço médio (Tabela 11), e em todas as concentrações na região apical da lamela primária, quando comparados ao grupo controle (Tabela 12).

Na comparação entre os sexos, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as concentrações dos experimentos de 96 h e de 17 dias em nenhuma das regiões da lamela primária.

Tabela 10. Espessura (μm) do epitélio lamelar das lamelas primárias na região basal das brânquias de machos e fêmeas de H. eques.

Grupo (mg.L ⁻¹)	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	33,38 \pm 8,13 ^a	19,53 \pm 3,95 ^a	19,86 \pm 4,80 ^a	18,00 \pm 3,71 ^a
0,01	57,13 \pm 14,54 ^b	51,80 \pm 13,80 ^b	48,01 \pm 11,99 ^b	47,70 \pm 17,03 ^b
0,1	52,90 \pm 14,42 ^b	49,42 \pm 13,97 ^b	56,50 \pm 14,90 ^{b*}	47,53 \pm 11,62 ^{b*}
1,0	53,60 \pm 14,94 ^b	49,75 \pm 17,78 ^b	56,90 \pm 20,06 ^b	49,64 \pm 17,60 ^b

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste t.

Tabela 11. Espessura (μm) do epitélio lamelar das lamelas primárias no terço médio das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	27,20 \pm 13,50 ^a	17,82 \pm 5,90 ^a	14,55 \pm 6,10 ^a	12,75 \pm 2,75 ^a
0,01	35,24 \pm 13,70 ^a	26,10 \pm 14,30 ^{ab}	22,11 \pm 5,11 ^{ab*}	29,02 \pm 12,71 ^{b*}
0,1	29,90 \pm 12,32 ^a	27,93 \pm 15,60 ^b	24,30 \pm 11,95 ^{ab}	24,63 \pm 10,24 ^b
1,0	34,10 \pm 13,27 ^a	30,79 \pm 12,67 ^b	19,43 \pm 10,90 ^{a*}	25,70 \pm 12,02 ^{b*}

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

Tabela 12. Espessura (μm) do epitélio lamelar das lamelas primárias na região apical das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	43,20 \pm 10,64 ^a	22,21 \pm 6,10 ^a	30,09 \pm 6,80 ^a	20,50 \pm 15,50 ^a
0,01	45,42 \pm 13,25 ^{abc}	49,54 \pm 14,82 ^b	56,20 \pm 15,80 ^b	52,22 \pm 19,80 ^b
0,1	55,21 \pm 18,60 ^b	55,44 \pm 22,35 ^b	52,70 \pm 15,20 ^b	49,30 \pm 12,97 ^b
1,0	61,66 \pm 14,50 ^c	51,01 \pm 17,30 ^b	57,80 \pm 14,01 ^b	53,23 \pm 19,10 ^b

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

5.3.2.3. Comprimento das lamelas primárias

Avaliando o comprimento das lamelas primárias nas brânquias de fêmeas, menor valor ($P<0,05$) encontrado na concentração 0,01 mg.L^{-1} em comparação com o grupo controle no experimento de 96 h (Tabela 13). Em machos, diferenças foram observadas ($P<0,05$) apenas no experimento de 17 dias nos peixes expostos a 0,01 mg.L^{-1} onde o comprimento das lamelas primárias foi menor em comparação com os animais do grupo controle e com as demais concentrações no mesmo experimento (Tabela 13).

Na comparação entre os sexos, os indivíduos machos apresentaram comprimento da lamela primária significativamente maior ($P<0,05$) em relação às fêmeas em todas as concentrações no experimento de 96 h (Tabela 13). Aumento significativo ($P<0,05$) também foi observado na concentração de 1,0 mg.L^{-1} no experimento de 17 dias (Tabela 13).

Tabela 13. Comprimento (μm) das lamelas primárias nas brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	961,70 \pm 204,36 ^a	897,53 \pm 262,50 ^a	1014,77 \pm 268,90 ^a	888,24 \pm 214,56 ^a
0,01	924,82 \pm 232,52 ^{a*}	687,14 \pm 237,50 ^{b*}	769,44 \pm 159,20 ^b	762,10 \pm 276,74 ^a
0,1	1261,70 \pm 1871,40 ^{a*}	795,11 \pm 197,00 ^{a*}	929,10 \pm 263,30 ^a	860,90 \pm 293,70 ^a
1,0	998,41 \pm 344,33 ^{a*}	751,13 \pm 195,61 ^{ab*}	936,93 \pm 234,44 ^{ab*}	775,60 \pm 230,16 ^{a*}

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

5.3.2.4. Comprimentos das lamelas secundárias

O comprimento das lamelas secundárias em fêmeas na região basal no experimento de 96 h mostrou diferença ($P<0,05$) nas concentrações de 0,01 e 1,0 mg L^{-1} em comparação com o grupo controle (Tabela 14). Analisando o terço médio, diferenças ($P<0,05$) foram observadas na concentração de 0,01 e 1,0 mg L^{-1} em comparação com o controle (Tabela 15). Os valores apresentados para o ápice mostraram diferenças ($P<0,05$) em todas as concentrações em comparação com o grupo controle (Tabela 16). No experimento de 17 dias, houve diferenças ($P<0,05$) para o comprimento das lamelas secundárias, em todos os grupos tratados, na base e terço médio quando comparados com o grupo controle (Tabelas 14 e 15), enquanto no ápice foram observadas diferenças ($P<0,05$) nos grupos expostos a 0,01 e 0,1 mg L^{-1} de Dimilin[®] em comparação ao grupo controle (Tabela 16).

O comprimento das lamelas secundárias em machos na região basal, e no terço médio foi diferente ($P<0,05$) do controle nas concentrações de 0,01 e 1,0 mg.L^{-1} (Tabelas 14 e 15), enquanto no ápice houve diferenças ($P<0,05$) em todas as concentrações em comparação ao grupo controle no experimento de 96 h (Tabelas 16). No experimento de 17 dias houve diferenças ($P<0,05$) na base, terço médio e ápice em todas as concentrações na comparação com o controle (Tabelas 14, 15 e 16).

Na comparação dos valores entre os sexos, machos obtiveram maior comprimento das lamelas secundárias em relação a fêmeas na região apical nos animais expostos a 0,1 mg.L^{-1} de Dimilin[®] durante 96 h (Tabela 16).

Tabela 14. Comprimento (μm) das lamelas secundárias no terço basal das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	103,83 \pm 35,33 ^{ab}	97,10 \pm 21,84 ^a	116,90 \pm 24,92 ^a	140,03 \pm 25,10 ^a
0,01	79,60 \pm 28,50 ^{a*}	69,54 \pm 28,10 ^{b*}	87,94 \pm 18,82 ^b	79,50 \pm 24,00 ^b
0,1	95,91 \pm 23,96 ^b	90,53 \pm 34,02 ^a	95,90 \pm 21,98 ^a	80,60 \pm 23,10 ^{bc}
1,0	76,81 \pm 25,63 ^a	72,85 \pm 21,49 ^b	99,20 \pm 20,80 ^{ab}	90,32 \pm 27,60 ^c

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

Tabela 15. Comprimento (μm) das lamelas secundárias no terço médio das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	131,90 \pm 21,40 ^a	108,60 \pm 20,81 ^{ab}	147,50 \pm 21,54 ^a	146,81 \pm 32,30 ^a
0,01	102,70 \pm 20,43 ^b	98,16 \pm 28,40 ^{ac}	112,90 \pm 25,60 ^b	98,45 \pm 25,43 ^b
0,1	121,70 \pm 30,93 ^a	113,10 \pm 20,97 ^b	123,20 \pm 25,55 ^b	111,20 \pm 24,16 ^c
1,0	105,20 \pm 28,50 ^{b*}	94,10 \pm 19,73 ^{c*}	118,83 \pm 23,90 ^b	117,20 \pm 28,01 ^c

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

Tabela 16. Comprimento (μm) das lamelas secundárias no terço apical das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	111,96 \pm 43,24 ^a	103,62 \pm 24,80 ^a	144,30 \pm 33,20 ^a	109,20 \pm 34,51 ^a
0,01	65,30 \pm 30,87 ^b	55,70 \pm 30,51 ^b	84,80 \pm 41,35 ^b	71,51 \pm 33,80 ^b
0,1	78,90 \pm 42,42 ^a	74,34 \pm 41,54 ^c	111,50 \pm 50,04 ^a	82,61 \pm 37,99 ^b
1,0	82,01 \pm 37,15 ^{ab}	71,80 \pm 32,80 ^c	99,52 \pm 39,50 ^{ab}	106,95 \pm 37,70 ^a

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P<0,05$) pelo teste t.

5.3.2.5. Quantificação dos focos de hemorragia

O número de focos de hemorragia em fêmeas nos experimentos de 96 h e 17 dias horas mostraram diferenças ($P < 0,05$) nas concentrações nos grupos expostos a 0,01 e 1,0 mg.L^{-1} em comparação com o grupo controle (Tabela 17). Nos indivíduos machos, do experimento de 96 h, houve diferenças ($P < 0,05$) apenas nos animais da concentração de 1,0 mg.L^{-1} em comparação com o grupo controle.

Fêmeas apresentaram maior quantidade ($P < 0,05$) de focos de hemorragias que machos na concentração de 0,01 mg.L^{-1} no experimento de 96 h, e nas concentrações de 0,01 e 1,0 mg.L^{-1} no experimento de 17 dias (Tabela 17).

Tabela 17. Quantificação de focos de hemorragias nas lamelas primárias das brânquias de machos e fêmeas de *H. eques*.

Grupo (mg.L^{-1})	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	$0,02 \pm 0,15^a$	$0,14 \pm 0,40^a$	0 ^a	$0,70 \pm 0,94^{ac}$
0,01	$0,07 \pm 0,26^{a*}$	$1,30 \pm 1,72^{b*}$	$0,04 \pm 0,20^{a*}$	$2,11 \pm 2,52^{b*}$
0,1	$0,09 \pm 0,40^a$	$0,05 \pm 0,22^a$	$0,09 \pm 0,30^a$	$0,24 \pm 0,55^a$
1,0	$1,60 \pm 1,06^b$	$1,12 \pm 1,50^b$	$0,06 \pm 0,24^{a*}$	$2,00 \pm 2,14^{bc*}$

Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste t.

5.3.2.6. Quantificação das células de cloreto

Na quantificação das células de cloreto houve diferenças ($P < 0,05$) nos grupos experimentais de 0,01 e 1,0 mg.L^{-1} em comparação com o grupo controle no experimento de 17 dias (Tabela 18). Em machos no experimento de 96 h foi encontrada quantidade significativamente menor ($P < 0,05$) de células de cloreto nos animais da concentração de 0,1 mg.L^{-1} (Tabela 18). Já no tempo de exposição de 17 dias, o número de células de cloreto foi significativamente maior ($P < 0,05$) na concentração de 0,01 mg.L^{-1} em comparação com o grupo controle (Tabela 18).

Na comparação entre os sexos, fêmeas apresentaram maior quantidade ($P < 0,05$) de células de cloreto que machos nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg.L^{-1} no tempo de exposição de 17 dias (Tabela 18).

Tabela 18. Quantificação das células de cloreto nas brânquias de machos e fêmeas de H. eques.

Grupo (mg.L ⁻¹)	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	5,30 ± 2,20 ^a	6,97 ± 4,20 ^a	2,72 ± 1,95 ^a	6,61 ± 2,60 ^a
0,01	4,90 ± 1,40 ^{ab}	5,70 ± 2,47 ^a	7,11 ± 3,40 ^b	9,33 ± 3,20 ^{bc}
0,1	3,05 ± 2,20 ^b	7,11 ± 2,70 ^a	4,00 ± 2,04 ^{ab*}	8,62 ± 3,35 ^{ab*}
1,0	5,00 ± 3,25 ^{ab}	6,62 ± 2,75 ^a	3,80 ± 2,10 ^{a*}	13,20 ± 5,73 ^{c*}

Os valores estão expressos como média±desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças (P<0,05) pelo teste de Tukey. Asteriscos na linha indicam diferenças (P<0,05) pelo teste t.

5.3.2.7. Quantificação das células de muco

Em relação ao número de células de muco em fêmeas houve diferenças (P<0,05) nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle no experimento de 17 dias (Tabela 19).

Nos indivíduos machos não foram observadas diferenças em relação ao grupo controle.

Quando comparados os valores entre os sexos, fêmeas apresentaram maior quantidade (P<0,05) de células de muco em todas as concentrações do experimento de 17 dias em relação aos machos do mesmo experimento (Tabela 19).

Tabela 19. Quantificação das células de muco nas brânquias de machos e fêmeas de H. eques.

Grupo (mg.L ⁻¹)	Machos 96 h	Fêmeas 96 h	Machos 17 dias	Fêmeas 17 dias
Controle	2,20 ± 1,81 ^a	1,90 ± 1,04 ^a	1,09 ± 0,83 ^a	1,22 ± 0,98 ^a
0,01	2,53 ± 1,50 ^a	2,06 ± 1,27 ^a	2,11 ± 0,80 ^{a*}	4,27 ± 2,50 ^{b*}
0,1	2,35 ± 1,41 ^a	1,94 ± 1,41 ^a	1,41 ± 0,90 ^{a*}	4,40 ± 2,10 ^{b*}
1,0	2,90 ± 1,40 ^a	1,75 ± 1,35 ^a	1,80 ± 1,64 ^{a*}	4,10 ± 2,41 ^{b*}

Os valores estão expressos como média±desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças (P<0,05) pelo teste de Kruskal-Wallis. Asteriscos na linha indicam diferenças (P<0,05) pelo teste t.

6. DISCUSSÃO

O peixe *Hyphessobrycon eques*, apresentou fácil adaptação às condições de laboratório, servindo como um ótimo modelo para futuros estudos com ensaios toxicológicos. É importante ressaltar que esta espécie, devido ao seu pequeno tamanho, é componente fundamental da dieta de espécies de peixes maiores e também de outros animais.

No presente estudo, as medidas de peso corporal e comprimentos total e padrão foram semelhantes em machos e fêmeas. Dentro da mesma espécie, peixes menores apresentam menor resistência ao Dimilin[®] quando comparados com peixes maiores (FISHER e HALL, 1992; NEBEKER et al., 1983). Assim, os grupos experimentais foram constituídos de lotes de tamanhos homogêneos para evitar interferência deste fator sobre o efeito do tóxico.

No que se refere a qualidade da água, os parâmetros avaliados encontravam-se em conformidade com as condições de cultivo e criação de peixes tropicais em geral (HUET, 1983), bem como com a resolução nº 357 do CONAMA (2005).

O pH esteve dentro da faixa considerada ideal para a espécie que é de 5,0 a 7,8 (CASAL, 2010). Os valores de temperatura ficaram entre os desejados para cultivo e criação de peixes tropicais, que varia entre 24,0 a 28,0°C (CYRINO et al., 2012) e para a espécie *H. eques*, cuja faixa ideal é de 22 a 26°C (CASAL, 2010). Já os valores de oxigênio estiveram superiores a 6mg/L, ideais para garantir um bom desenvolvimento dos peixes (CYRINO et al., 2012).

Os teores médios de amônia não ionizada encontrados nos experimentos foram de 0 a $0,25 \pm 0,001 \text{ mg.L}^{-1}$. Esses valores não apresentaram qualquer risco de toxicidade para os peixes, pois se encontram dentro dos valores de tolerância estabelecidos para peixes tropicais. Concentrações de amônia com valores entre 0,15 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ podem levar à diminuição do crescimento dos peixes (KUBITZA et al., 1999; HUET, 1983), o que não ocorreu no presente estudo. Os valores de dureza total encontrados foram superiores a 20 mg.L^{-1} . Valores aceitáveis estão entre 20-400 mg.L^{-1} , que devem ser mantidos para um ótimo crescimento de organismos aquáticos (SWANN, 2008).

Pouco se sabe sobre a sensibilidade do *H. eques* frente à ação de agrotóxicos. Poucos ensaios foram realizados. NUNES (2011) calculou a CL_{50-96h} de Roundup Transorb[®] para *H. eques* expostos a concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0

mg.L⁻¹ encontrando o valor de 2,64 mg.L⁻¹. A espécie mostrou-se sensível à exposição subletal a este inseticida apresentando alterações na morfologia testicular (NUNES, 2011). H. eques apresentaram comportamento anormal, como agitação, perda da capacidade de arfagem, espasmos musculares e natação errática, após exposição às concentrações de 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 mg.L⁻¹ do inseticida fipronil (IGNÁCIO, 2014). Alguns outros autores estudaram os efeitos de agrotóxicos para a espécie H. eques (ABE, 2012; GOULART, 2012; CRUZ et al., 2014; LEANDRO, 2014). Portanto, estudos que determinam a capacidade de biocacumulação do Dimilin[®] para esta espécie serão de extrema importância para avaliar o potencial toxicológico deste produto e sua transferência na cadeia alimentar.

A exposição a concentrações subletais do inseticida Dimilin[®] causou alterações significativas na morfologia branquial do H. eques mesmo nas concentrações mais baixas. Estas alterações foram também descritas em outras espécies de teleósteos expostas a esse e outros inseticidas (BORAN et al., 2010; SHIOGIRI et al., 2012; BENZE, 2014), bem como expostos a outros contaminantes (REISER et al., 2010; BARJA-FERNÁNDEZ et al., 2013; RASKOVIC' et al., 2014).

As brânquias respondem à presença de xenobióticos tóxicos na água através das denominadas respostas de defesa que previnem a entrada da substância no organismo, e/ou compensatórias que possibilitam o aumento de uma determinada função para sobrepor o efeito deletério do xenobiótico (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; FERNANDES e MAZON, 2003; CRESTANI et al., 2007; PAULINO et al., 2012; SHIOGIRI et al., 2012).

A elevação do epitelial é uma das primeiras alterações que ocorrem quando o animal está sob algum tipo de estresse (WINKALER et al., 2001). Esta alteração caracteriza-se pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio lamelar, acarretando aumento da distância de difusão entre a água e o sangue, assim diminuindo área de superficial branquial. Nesse sentido, a eficiência das trocas gasosas e o transporte iônico ficam prejudicados (WINKALER et al., 2001). Essas observações foram encontradas em todos os peixes no presente estudo expostos ao DFB, assim como observado em outros trabalhos (PESCE et al., 2008; SAMANTA et al., 2015; OSTASZEWSKA et al., 2015) com diferentes contaminantes. Esses resultados comprovam que o tóxico interferiu de forma negativa na estrutura do epitélio lamelar, podendo comprometer o sistema respiratório dos peixes.

Uma das alterações observadas foi a hiperplasia do epitélio lamelar. Quando ocorre hiperplasia entre as lamelas secundárias, ocorre proliferação celular, fusão das lamelas levando a um aumento da espessura da lamela e, conseqüentemente, diminuição do espaço para a passagem da água. Como consequência, o oxigênio não se difunde no tecido branquial, prejudicando a sobrevivência do organismo. Além disso, a distância da barreira água-sangue aumenta e, junto com a elevação do epitélio, podem diminuir drasticamente o consumo de oxigênio como resposta de defesa do organismo ao tóxico (KOCA et al., 2005). A hiperplasia de células do epitélio lamelar e fusão das lamelas foram alterações encontradas nos tecidos branquiais expostos ao DFB na maioria das concentrações testadas, sendo atribuídas como uma resposta secundária e dificultando a entrada do poluente na corrente sanguínea como resposta de defesa do organismo.

Segundo OSTRENSKI et al. (2001), danos branquiais como a proliferação tecidual (hiperplasia interlamelar), fusões lamelares e elevação do epitélio branquial, têm forte correlação com a contaminação aguda (ROSSI, 2008). Estas lesões também são mecanismos de defesa branquiais que reduzem a área superficial em contato com o meio externo, e também aumentam a barreira para difusão do poluente (LAURÉN e MCDONALD, 1985; VAN HEERDEN et al., 2004). Se o agente irritante não for removido, ele pode ainda levar à ruptura dos vasos sanguíneos e à formação de pequenos focos hemorrágicos (JIRAUNGKOORSKUL et al., 2002).

O desarranjo lamelar secundário foi encontrado nas brânquias de *H. eques* em todos os grupos testados com DFB. De acordo com SKIDMORE E TOVELL (1972), substâncias tóxicas nas brânquias parecem quebrar a aderência entre as células epiteliais branquiais e as células pilares, o que é acompanhado por um colapso da integridade estrutural das lamelas secundárias (desarranjo) e subsequente falha do funcionamento respiratório das brânquias. Nesse sentido, a integridade branquial em *H. eques* foi comprometida, assim como verificado em outros peixes expostos a contaminantes (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; NERO, et al., 2006; SANTOS et al., 2014), diminuindo o funcionamento respiratório dos organismos.

A dilatação dos espaços sanguíneos e congestão vascular foi uma das alterações mais frequentes em todos os grupos de peixes expostos ao DFB. Esta alteração pode conduzir a um processo progressivo de alterações teciduais como congestão sanguínea, aneurisma e ruptura do epitélio branquial, com conseqüente hemorragia que, dependendo da intensidade, leva a uma redução da volemia e perda da capacidade de

transporte de gases (FERNANDES e MAZON, 2003; PAULINO et al., 2012). No presente estudo, evidenciou-se hemorragia com ruptura dos epitélios, o que causa perda da integridade estrutural e fisiológica das brânquias nas concentrações Dimilin® testadas. A congestão vascular é provocada por aumento do fluxo de sangue no vaso, sendo caracterizada como um aneurisma em estágio inicial.

Segundo a literatura, algumas dessas alterações aqui descritas (ou seja, a fusão lamelar ou elevação do epitélio) são progressivas em condições inalteradas, levando a danos irreparáveis da morfologia e função da brânquia, enquanto outros (ou seja, hiperplasia de células e hipertrofia, e hipersecreção de muco) são regressivos se o agente poluente é removido (POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994; CAMARGO e MARTINEZ, 2007).

As lesões detectadas neste estudo representam defesa do órgão, as quais culminam em alterações na estrutura branquial, o que pode levar à menor eficiência da mesma. Diversos outros autores estudaram os efeitos de contaminantes na morfologia das brânquias (BORAN et al., 2010; SHIOGIRI et al., 2012; BARJA-FERNÁNDEZ et al., 2013; RASKOVIC´ et al., 2013; MELO et al., 2014; NUNES et al., 2015). Entretanto, pouco se sabe sobre possíveis reações específicas dos sexos dos peixes no que diz respeito à ação de poluentes. PROCÓPIO et al. (2014) estudando a influência do sexo em respostas a biomarcadores histológicos em brânquias de *Prochilodus argenteus* de um rio poluído no sudeste do Brasil, encontrou as mesmas alterações histológicas detectadas no presente estudo, nas brânquias dos peixes de ambos os sexos, e concluiu que a maioria das histopatologias analisadas foram influenciados pelo sexo, com exceção da hiperplasia lamelar, fornecendo evidências da reação específica do sexo dos peixes em alguns biomarcadores na presença de contaminações ambientais.

A severidade das lesões depende da concentração e do período de exposição do organismo ao contaminante (OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 1996). Nesse sentido, é esperado nas exposições crônicas que um agente tóxico cause mais alterações irreversíveis do que em exposições de curta duração (CERQUEIRA e FERNANDES 2002; REISER et al., 2010; HUED et al., 2011), fato este não observado no presente estudo, uma vez que as incidências de lesões nas brânquias no experimento de 96 h e 17 dias foram semelhantes. A toxicidade de um produto pode estar relacionada à persistência do tóxico na água, visto que a meia vida do Dimilin® em água doce varia entre 2,1 e 7,9 dias, sob condições de pH de 10 e 7,7, respectivamente, e temperaturas

variando entre 10 e 38° C (SCHAEFER e DRUPAS, 1976), sendo considerado um composto pouco persistente em ambientes de água doce. Portanto, os valores médios de temperatura e pH apresentados no presente estudo foram favoráveis para a baixa persistência do tóxico na água com alterações leves a moderadas nas brânquias nos experimentos de 96 h e 17 dias. Por outro lado, são poucos os relatos sobre a meia vida do Dimilin® na água, o que torna difícil estabelecer o intervalo ideal para a renovação desse inseticida com o intuito de manter a concentração desejada constante na água.

Assim, os danos observados nas brânquias de H. eques devido à exposição ao Dimilin®, sua distribuição e a gravidade das lesões nesses órgãos dada pelos índices VMA e IAH, indicam que o DFB causa alterações leves a moderadas nas brânquias de H. eques de acordo com a classificação de POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC (1994), e que, embora reversíveis, podem comprometer o funcionamento normal das brânquias e exigir um custo metabólico para superar estes danos, que podem resultar em redução na taxa de crescimento e prejudicar o sucesso reprodutivo da espécie após longos períodos de exposição. É importante dizer que o epitélio branquial de peixes é extremamente sensível, dinâmico e metabolicamente ativo (POLEKSIK, MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994), e que, portanto, mesmo as lesões mais brandas consistem em sinais iniciais de que o órgão está respondendo a estas alterações. O IAH mostrou que a incidência de lesões nas brânquias aumentou à medida que as concentrações aumentaram, indicando um efeito de dependência dose-resposta. O VMA permaneceu, de maneira geral, na escala grau II, indicando lesões pontualmente localizadas no tecido branquial que, embora reversíveis, podem comprometer o funcionamento normal das brânquias e exigir um custo metabólico para superar estes danos, que podem resultar na redução na taxa de crescimento e prejudicar o sucesso reprodutivo da espécie após longos períodos de exposição.

Em *Prochilodus lineatus* expostos a 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de Dimilin® durante 14 dias, os valores de IAH encontrados nas brânquias foram superiores ao índice 10, evidenciando lesões leves a moderadas (BENZE et al., 2014), assim como observado no presente estudo e no trabalho de HUED et al. (2011) ao estudarem os efeitos do glifosato nas brânquias de *Jenynsia multidentata*. Já SHIOGIRI et al., (2012) encontraram valores de IAH inferiores a 10 nas brânquias de *Piaractus mesopotamicus* expostos a diferentes concentrações do herbicida glifosato. Os dados observados pelo IAH nos mostram distribuição de alterações leves a moderadas nas brânquias de H.

equos. Embora sejam na maioria alterações reversíveis, podem comprometer o funcionamento normal das brânquias.

O índice de lesões nas brânquias de H. equos de ambos os sexos se elevou à medida que a concentração do tóxico aumentou na água, indicando um efeito de dose-dependência. Todas as lesões aqui descritas foram encontradas tanto em machos quanto em fêmeas, na mesma proporção, indicando que não houve reação específica do sexo, sugerindo que brânquias de machos e fêmeas H. equos não reagem de maneira diferente após exposição às diferentes concentrações do inseticida Dimilin[®] em diferentes tempos de exposição.

A exposição a concentrações subletais de Dimilin[®], além de ter causado alterações histopatológicas, causou também alterações na morfometria das brânquias de machos e fêmeas de H. equos. Porém, os parâmetros avaliados para a morfometria mostraram poucas diferenças entre machos e fêmeas, sendo que a maioria dos grupos analisados não apresentaram diferenças entre os sexos, não evidenciando, portanto, uma reação específica dos sexos após exposição subletal ao inseticida de Dimilin[®], assim como observado nos biomarcadores histopatológicos já descritos anteriormente.

A análise estatística da morfometria mostrou aumento do diâmetro do vaso e da lamela primária nas três regiões em todos os grupos tratados. Normalmente, o diâmetro do sistema vascular, ocorre devido a alterações morfológicas, como elevação do epitélio filamentar e ruptura das células epiteliais que geralmente resultam de resposta aguda e direta do agrotóxico no epitélio branquial (TEMMINK et al., 1983). A análise morfométrica do sistema vascular também foi estudada em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Peixes do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Em um destes estudos, MORAES (2011) encontrou diferenças na espessura do vaso na região apical nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus* expostas a concentrações de 1,3 e 5,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Thiodan[®], sendo que o maior valor de diâmetro foi encontrado na menor concentração. Em outro estudo, SOUSA (2014) encontrou menor diâmetro do sistema vascular nos terços basal, médio e apical em peixes da espécie *Astyanax bimaculatus* coletados em microbacias agroecológicas em comparação com peixes coletados nas microbacias convencionais, onde são usados agrotóxicos, o que indica que o uso de agrotóxico nessa área afeta negativamente a qualidade da água e, conseqüentemente, a saúde dos peixes.

No presente estudo observou-se o aumento da espessura da lamela primária, que pode ter ocorrido devido à hiperplasia das células do epitélio lamelar primário ou pela dilatação do vaso sanguíneo, ambas patologias encontradas com bastante frequência neste estudo. SHIOGIRI et al. (2012) estudando os efeitos do herbicida glifosato em brânquias de *Piaractus mesopotamicus* também observaram aumento na espessura da lamela primária devido à grande ocorrência de hiperplasia do epitélio lamelar. RASKOVIC' et al. (2014) observaram as mesmas alterações na espessura da lamela primária das brânquias de *Barbus barbus* e *Acipenser ruthenus* coletados no Rio Danúbio (Belgrado, Sérvia) sob a presença de poluentes como Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Pb, Se e Zn.

O comprimento das lamelas primárias não foi afetado pela ação do tóxico no presente estudo. De forma geral, os valores obtidos nos grupos tratados não apresentaram diferença em relação ao grupo controle. Portanto, pode-se dizer que o crescimento da lamela primária em comprimento nas brânquias de *H. eques* não foi afetado após a exposição às diferentes concentrações do inseticida Dimilin[®]. Com relação às lamelas secundárias, foi observada redução do comprimento nos terços basal, médio e apical na maioria dos grupos tratados em ambos os sexos quando comparados com o grupo controle. Portanto, a exposição subletal ao Dimilin[®] levou a uma deficiência no desenvolvimento das lamelas secundárias de *H. eques*, resultando no encurtamento das mesmas. POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDIZIC (1994) explicam que a diminuição das lamelas secundárias pode levar à fusão de todas elas, podendo influenciar no processo de trocas gasosas nas brânquias provocando uma deficiência na difusão dos gases entre as lamelas. O encurtamento das lamelas secundárias foi observado por HUED et al. (2012) ao avaliarem as brânquias de *Jenynsia multidentata* expostas a 0,5 mg.L⁻¹ de Roundup[®], observando encurtamento das lamelas secundárias nos peixes após 28 dias de exposição. Ainda, BARJA-FERNÁNDEZ et al. (2013) também observaram encurtamento lamelar secundário nas brânquias do peixe *Psetta maxima* expostos a concentrações de 0,03 e 0,3 µg.L⁻¹ de BDE-47 (2,2', 4,4'-tetra bromo-difenil éter).

O aparecimento dos focos de hemorragia nos grupos tratados do presente estudo pode estar associado com a dilatação da espessura do vaso sanguíneo devido ao aumento do fluxo sanguíneo. SOUSA (2014) também encontrou focos de hemorragias em *Astyanax aff. bimaculatus* coletados em microbacias convencionais da bacia do rio São

Joaquim, Araponga-MG. Esta alteração também foi observada por WINKALER et al., (2001), PAULINO et al., (2014) e SANTOS et al. (2014) ao avaliar as brânquias nas espécies *Astyanax altiparanae*, *A. fasciatus*, *Pimelodus maculatus*, *Centropomus undecimalis* e *Sardinella sp* coletados em ribeirões e Lagoas contaminados.

As células de cloreto, responsáveis por intercâmbios iônicos, são geralmente concentradas na lamela primária, mas também podem ser encontradas entre as lamelas secundárias, já que, na presença de um agente estressor, essas células se proliferam para esta região. Entretanto, além do transporte de Na^+ , Cl^- e Ca^{+2} , essas células podem eventualmente acumular metais pesados e outras substâncias tóxicas (FRACÁCIO et al., 2003). No geral, o número de células de cloreto dos animais tratados não foi diferente quando comparados com animais do grupo controle, com exceção apenas das fêmeas do experimento de 17 dias que apresentaram aumento significativo dessas células. Sob condições iônicas desfavoráveis ou em contato com agentes tóxicos, células de cloreto proliferam nos filamentos e na superfície lamelar das brânquias (PERRY, 1997). Assim, a proliferação de células de cloreto é uma resposta compensatória para aumentar a absorção de íons e manter a homeostase iônica e osmótica quando alterada pelo xenobiótico (FERNANDES e MAZON, 2003).

As células de muco são responsáveis por produzir o muco, que forma uma barreira diminuindo a difusão dos agentes tóxicos do meio aquático para o sangue, apresentando, então, função de proteção do tecido branquial (HANDY et al., 1989). Além disso, segundo HANDY e EDDY (1989), próximo ao muco há uma maior concentração de Na^+ e Cl^- do que na água circundante, o que pode reduzir a perda de íons por difusão na superfície branquial e favorecer a absorção desses íons. Segundo MITTAL et al. (1994), o muco secretado pelas células mucosas é constituído por macromoléculas complexas que possuem natureza diversificada dentre as quais se encontram as glicoproteínas. Alterações na área e frequência das células mucosas nas brânquias têm sido considerada como uma resposta às alterações na composição iônica (LAURENT e HEBIBI, 1989; MORON et al., 2003), concentração de cálcio (PERRY e WOOD, 1985) e presença de agentes tóxicos no meio aquático (WENDELAAR BONGA et al., 1989). Porém, no presente estudo, não foi observada alteração no número das células de muco nos grupos tratados com exceção de fêmeas expostas ao Dimilin® no experimento de 17 dias, que demonstraram aumento discreto dessas células. Por outro lado, as células de muco podem ter aumentado a produção do muco

formando uma barreira, dificultando a passagem do tóxico e impedindo o mesmo de causar alterações mais severas no tecido branquial. Sugere-se que as células de cloreto e células de muco de *H. eques* podem estar em processo inicial de adaptação para manter o equilíbrio e a regulação osmótica nas concentrações de Dimilin[®] testadas no experimento por 17 dias.

A análise morfométrica das brânquias de machos e fêmeas mostrou alterações no diâmetro dos vasos sanguíneos e do epitélio lamelar primário, no comprimento das lamelas primárias e secundárias, além do aparecimento de focos de hemorragias, em todas as concentrações de Dimilin[®] testadas. Estas alterações, além de comprometer o arranjo estrutural do tecido, podem ter ocasionado disfunção respiratória.

O Dimilin[®] é um inseticida utilizado em grande escala no Brasil tanto na agricultura quanto em sistemas de cultivo de peixes, mas são poucos os dados referentes a ação deste inseticida para peixes neotropicais. A exposição a concentrações subletais deste inseticida causou alterações significativas na morfologia branquial do *H. eques* mesmo nas concentrações mais baixas, prejudicando o funcionamento normal do órgão. Portanto, torna-se necessário a realização de mais estudos de toxicidade para que sejam estabelecidos critérios seguros para esses animais, afim de evitar danos à saúde e prejuízos de ordem econômica. Estes fatores justificam a continuidade da pesquisa para avaliar o potencial efeito tóxico deste inseticida, utilizando diferentes biomarcadores e outras espécies de peixes neotropicais, principalmente aqueles que são utilizados para o consumo humano, já que o Dimilin[®] pode acumular no corpo desses animais e podem trazer risco também à saúde de quem os consome.

Este estudo mostrou, ainda, que machos e fêmeas de *H. eques* submetidos às mesmas condições de contaminação pelo Dimilin[®], não apresentaram reação específica na morfologia branquial influenciada pelo sexo, com base nos biomarcadores avaliados. Por isso, o presente estudo destaca a importância e a necessidade de mais estudos afim de responder e melhor compreender a hipótese da possível reação específica do sexo em resposta à ação de contaminantes ambientais.

7. CONCLUSÕES

O inseticida Dimilin[®] apresentou potencial tóxico para H.eques nas concentrações subletais, causando alterações leves a moderadas na morfologia branquial.

O Dimilin[®] demonstrou ser mais tóxico à medida que as concentrações aumentaram, indicando um efeito de dependência dose-resposta.

As alterações identificadas nas brânquias de H. eques expostos a concentrações subletais do Dimilin[®], como hiperplasia do epitélio, fusão parcial de lamelas secundárias, bem como a elevação do epitélio lamelar, são respostas que podem ter reduzido a difusão do DFB, impedindo que o tóxico causasse alterações mais graves neste tecido.

A hipótese de que as brânquias reagem de maneira diferente entre os sexos quando expostas a contaminantes ambientais não foi comprovada no presente estudo, já que os biomarcadores morfológicos estudados não mostraram uma resposta específica do sexo para as concentrações subletais de Dimilin[®] que foram testadas (0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) e para os tempos de exposição estudados (96 h e 17 dias).

As análises histopatológicas e morfométricas das brânquias de H. eques constituíram biomarcadores úteis para avaliação da contaminação aquática.

H. eques pode ser considerado bioindicador da contaminação ambiental, e pode ser utilizado como modelo em ensaios toxicológicos.

Os achados advertem que o uso indiscriminado do Dimilin[®] pode afetar a integridade estrutural das brânquias, causando vários distúrbios na saúde e bem-estar dos peixes em sistemas de cultivos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F. R. **Avaliação ecotoxicológica e risco ambiental dos inseticidas utilizados no controle da larva de *Aedes aegypti* para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e peixes.** 2012. 144 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Biologia de Organismos Aquáticos), Universidade estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2012.
- AGUINAGA, J. Y.; CLAUDIANO, G. S.; MARCUSO, P. F.; IKEFUTI, C.; ORTEGA G. G.; ETO, S. F.; DA CRUZ, C.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; FERNANDES, J. B. K. Acute Toxicity and Determination of the Active Constituents of Aqueous Extract of *Uncaria tomentosa* Bark in *Hyphessobrycon* eques. **Journal of Toxicology**, v. 2014, ID 412437, 5p. 2014.
- AITIO, A. Biological monitoring and biomarkers. In: NORDBERG, G.; FOWLER, B.; NORDBERG, M. FRIBERG, L. (Eds) **Handbook on the toxicology of metals.** 3° Ed., San Diego, California: Elsevier, p.65-78, 2007.
- ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D.; SANTOS, G.B.; VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 6(3):621-627, 2009.
- ALVES, C. B. M.; VIEIRA, F.; MAGALHÃES, A. L. B.; BRITO, M. F. G.; Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: Bert TM (ed.), **Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities.** Dordrecht, Kluwer Scientific Publications, The Netherlands, p. 291-314, 2007.
- ANVISA – AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UFPR. Seminário MERCADO DE AGROTÓXICO E REGULACAO, Brasília, 2012. In: Dossiê ABRASCO: **Uma alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro/São Paulo, 2015. 628p.
- ARAÚJO, A. **Toxicologia aquática: metodologias e aplicação.** São Paulo, p.32, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648:** Água - Ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). 1992.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** Água - Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). 1993.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15088 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes.** 2. ed. ABNT: versão corrigida 31/03/2006. p.19. 2006 - Parte 1 - Sistema estático - Método de ensaio. Rio de Janeiro, NBR 15088, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15499. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com peixes.** 21p. 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes.** 22p. 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Dossiê ABRASCO: Uma alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro/São Paulo, 2015. 628p.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: Editora Rima, São Paulo, 2003, 340 p.
- BADELLINO, C. **Controle eletroquímico de herbicida em soluções aquosas: estudo da degradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético.** 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

- BARIŠIĆ, J.; DRAGUN, Z.; RAMANI, S.; MARIJIĆ, V. F.; KRASNIĆI, N.; ČOŽ-RAKOVAC, R.; KOSTOV, V.; REBOK, K.; JORDANOVA, M. Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, V. 118, P. 158-166, 2015.
- BARJA-FERNÁNDEZ, S.; MÍGUEZ, J. M.; ÁLVAREZ-OTERO, R. Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 95, 60–68, 2013.
- BARRETO, T. R. **Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (FOLISUPER 600 BR®)**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2006.
- BENZE, T. P. **Efeitos da exposição ao inseticida diflubenzuron em curimatá, Prochilodus lineatus (Teleósteo, Prochilodontidae)**. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2013.
- BENZE, T. P.; SAKURAGUI, M. M.; DE PAULA ZAGO, L. H.; FERNANDES, M. N.; Subchronic exposure to diflubenzuron causes health disorders in neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology** doi: 10.1002/tox.22065. 2014.
- BORAN, H.; CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; TERZI, E. Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 175-179, 2010.
- BOTELHO, R. G. **TOXICIDADE DE HERBICIDAS PARA Escherichia coli E ALEVINOS DE Ctenopharyngodon idella**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, MG, 2010.
- BOTELHO-FILHO, G. F. **Síntese da história da aquariofilia**. Rio de Janeiro: Interciência, 88p, 1990.
- BRANDÃO, F.P.; PEREIRA, J.L.; GONÇALVES, F.; NUNES, B. The Impact of Paracetamol on Selected Biomarkers of the Mollusc Species *Corbicula fluminea*. **Environmental Toxicology**, v.29, p.74-83, 2011.
- BRIGANTE, J.; ESPINDOLA, E. L. G. Praguicidas no sedimento do rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J.; ESPINDOLA, E.L.G. **Limnologia fluvial: Um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos: Rima, p.121-128, 2003.
- CAMARGO, M. M. P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p.40-46, 2009.
- CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, 5, 3, 327-336, 2007.
- CAMPAGNA, A.F. **Toxicidade dos sedimentos da bacia hidrográfica do rio Monjolinho (São Carlos – SP): ênfase nas substâncias cobre, aldrin e heptacloro**. 2005. 268 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.
- CASAL, C. M. V. FishBase. **World Wide Web Electronic Publication**. 2010. Disponível em <<http://www.fishbase.org>> Acessado em: 15 de fevereiro de 2014.
- CAVICHIOLO, F. Histologia: Ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Empraba Amapá, 2009. cap. 23, p. 602-634, 2009.
- 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**, 52, 83-91, 2002.
- COBEA – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. **Princípios Éticos**. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65> Acesso em: 10 março 2013.

- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma CETESB L5.019-II:** Água - Teste de toxicidade aguda com peixes - Parte II - Sistema Semi-Estático.1990.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Norma CETESB L5.018:** Água - Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladorcera, Crustácea). 1994.
- CONAMA, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, **Resolução CONAMA nº 357, 17 de março de 2005**, Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, p. 58-63.
- COSTA, C. G.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. **31**, N. 7, p. 1820-1830, 2008.
- COUTINHO, C.; GOKHALR, K. S. Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultured in secondary sewage effluent. **Journal Water Research**, v. 34, n. 11, p. 2997-3004, 2000.
- CRESTANI, M.; MENEZES, C.; GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; SPANEVELLO, R.; SILVEIRA, A.; GONÇALVES, F. F.; ZANELLA, R.; LORO, V. L. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, 67, 2305-2311, 2007.
- CRUZ, C.; SILVA, A.F.; SHIOGIRI, N.S.; GARLICH, N.; PITELLI, R.A. Imazapyr herbicide efficacy on floating macrophyte control and ecotoxicology for non-target organisms. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 103-108, 2015.
- CYRINO, J. E. P.; SAMPAIO DE OLIVEIRA, A. M. B. M.; COSTA, A. B. **Curso – Introdução à Piscicultura**. Disponível em <<http://projelopacu.com.br/public/paginas/215-apostila-esalq-curso-atualizacao-em-piscicultura.pdf>> Acessado em 18 jun 2015.
- DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: via de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia em meio ambiente**, v.9, p.1-18, 1999.
- EATON, A.D.; CLESCERI, L.S.; RICE, E.W.; GREENBERG, A.E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. Ed. Maryland: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. p.1082, 2005.
- EDWIN, D. O. Control of water pollution from agriculture. **FAO Irrigation and Drainage Paper**. p. 1-101, 1996.
- EISLER, R. Diflubenzuron hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. **Fish Wildlife service and biological report**, v.4, n.25, p.1-36. 1992.
- EVANS, D. H. The fish gill: Site of action and, odel for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspective.**, 71: 47-58, 1987.
- FAO. The state of world fisheries and aquiculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome, 180p, 2007.
- FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: Val., A. L., KAPOOR, B. G. (Eds.), **Fish Adaptations**. Science Publishers, Inc. Enfield, USA, 203–231, 2003.
- FERNANDES, M. N.; PERNA MARTINS, S. A. Epithelial gill cells in the armored catfish *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Loricariidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 1, p. 69 – 78, 2001.
- FISHER, S. A.; HALL, L.W. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflubenzuron (Dimilin). **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 45-79, 1992.
- FLOTEMERSCH, J. E.; STRIBLING, J. B.; PAUL, M. J.; SNYDER, B. D. Fish. In: FLOTEMERSCH, J. E.; STRIBLING, J. B.; PAUL, M. J. Concepts and approaches for the bioassessment of Non-wadeable Streams and Rivers. Cincinnati, Ohio: USEPA, p.7.1-7.26, 2006.
- FRACÁCIO, R.; VERANI, N. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; ROCHA, O.; RIGOLIN-SÁ, O.; ANDRADE, C. A. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae) exposed to the toxic sediments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.4, p.685-695, 2003.

- GLOBO. Por que o Brasil é um mercado fértil para agrotóxicos proibidos. Disponível em: <http://g1.globo.com/natureza/noticia/2015/04/por-que-o-brasil-e-um-mercado-fertil-para-agrotoxicos-proibidos.html>. Acesso em: 03 Abril 2015.
- GOULART, A. M. A. **Efeitos toxicológicos do Dimilin em machos adultos de Hyphessobrycon eques (Steindachner, 1882) (Teleostei:Characidae)**. 2012. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.
- GRAÇA, W. J. I.; PAVANELLI, C.S. **Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, p. 241, 2007.
- GRAÇAS SILVA, A. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2004.
- GUERESCHI, R. M. **Macroinvertebrados bentônicos em córregos da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP: subsídios para monitoramento ambiental**. 2004. 82 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlo, São Carlos, SP, 2004.
- GUNDERSEN, D. T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S. D.; MILLAR, J. G. BLAZER, V. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordan-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19 (9), p. 2275-2285, 2000.
- HANDY, R. D.; EDDY, F. B.; ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminum and zinc toxicity. **Journal of Fish Biology**, v. 35, p. 737-747, 1989.
- HANDY, R. D.; RUNNALS, T.; RUSSEL, P. M. Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in southern England that meet the freshwater fisheries directive. **Ecotoxicology**, v.11, p.467-479, 2002.
- HEATH, A. C. **Water Pollution and Fish Physiology**, 2ªEd. Lewis, Boca Raton, 1995, 494p.
- HEIN, G. *Hyphessobrycon pando* sp. n., a new rosy tetra from northern Bolivia (Teleostei, Characiformes, Characidae). **Bulletin of Fish Biology**, v.10, p.1-10, 2008.
- HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; 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.
- HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, n. 8, p. 51-66, 1990.
- HUED, A. C.; OBERHOFER, S.; BISTONI, M. A. Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup_) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 107-117, 2012.
- HUET, M. **Tratado de piscicultura**. Madrid: MundiPrensa, 3 ed. p.615, 1983.
- IGNÁCIO, N. F. **Seleção de bioindicadores aquáticos pela toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida fipronil**. 65 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2014.
- ISLAS-FLORES, H.; GÓMEZ-OLIVÁN, L.M.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; COLÍNCRUZ, A.; NERICRUZ, N.; GARCÍA-MEDINA, S. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.92, p.32–38, 2013.
- JESUS, T. B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para a avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia brasiliensis**, v.12, p. 680-693, 2008.

- JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAMA, E. S.; KRUATRACHUEA, M.; SAHAPHONGC, S.; VICHASRI-GRAMSA, S.; POKETHITIYOOKA, P. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Science Asia**, v.28, p.121-127, 2002.
- JOBLING, M. Osmotic and ionic regulation – water and salt balance. **Environmental Biology Fishes**, v.16, p.211-249. 1995.
- KLAASSEN C.D. Casarett; Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th Edition. **McGraw-Hill**, p. 133-224, 2001.
- KOCA, Y. B.; KOCA, S.; GÜRCÜ, B.; OSANÇ, E.; TUNÇBAS, O.; AKSOY, G. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Çine stream (Aydin/Turkey) with determination of water pollution. **Environmental Toxicology**, n.20, p.560-571, 2005.
- KUBITZA, F.; LOVSHIN, L. L.; ONO, E. A.; SAMPAIO, A. V. **Planejamento da produção de peixes**. 3. ed. rev. ampliada. Jundiaí: F. Kubitza, p.77, 1999.
- LAURÈN, D. J.; MCDONALD, D. G. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: modulation by water hardness and pH. **Journal of Comparative Physiology B**, v.155, p.635-644, 1985.
- LAURENT, P., HEBIBI, N. Gill morphometry and fish osmoregulation. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 3055-3063, 1989.
- LAURENT, P., PERRY, S. F. Environmental effects on fish gill morphology. **Physiological Zoology**. v. 64, p. 4-25, 1991.
- LEANDRO, M. V. **Descrição morfo-histológica do ovário do peixe *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei:Characidae) e efeitos do inseticida diflubenzuron na morfologia ovariana**. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.
- LOURENCETTI, C.; SPADOTTO, C. A.; SANTIAGO-SILVA, M.; RIBEIRO, L. M. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.15, p. 1-14, 2005.
- MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundias, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Scientiarum. Biological Science**, v. 28, p. 159-163, 2006.
- MABILIA, R. G.; SOUZA, S. M. G.; SCHIFFINO, L. Uso do Diflubenzuron na aquicultura no tratamento de ectoparasitoses – restrições de uso. In: **Congresso Estadual de Medicina Veterinária**, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2004.
- MACHADO, JMH. Uma agenda necessária. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, vol. 37, n. 125, p. 39-41, 2012.
- MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 148, p. 265–272, 2008.
- MADUENHO, L. P. **Parâmetros morfo-funcionais de *Prochilodus lineatus* após exposição aguda ao inseticida Dimilin**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2007.
- MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p. 355-381, 2008.
- MARCON, L. **Efeitos do Thiodan® em fígado e em ovários em maturação avançada de lambaris *Astyanax bimaculatus***. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.
- MARCON, L.; MOUNTEER, A. H.; BAZZOLI, N.; BENJAMIN, L. A. Histological and Histometric Evaluation of the Liver in *Astyanax Bimaculatus* (Teleostei: Characidae), Exposed to Different Concentrations of an Organochlorine Insecticide. **The Anatomical Record**, v. 298, p.1754–1764, 2015a.

- MARCON, L.; MOUNTEER, A. H.; BAZZOLI, N.; BENJAMIN, L. A. Effects of insecticide Thiodan® on the morphology and quantification of ovarian follicles in lambaris *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) in different treatments. **Aquaculture Research**, doi:10.1111/are.12687, 2015b.
- MARCON, L.; SILVA FILHO, P. B.; LOPES, D. S.; MOUNTEER, A. H.; BENJAMIN, L. A. O inseticida Thiodan® sobre o desenvolvimento folicular de lambaris. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2245–2251, 2014.
- MARTINS, F.; SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.2, p.135-138, 2004.
- MATAQUEIRO, M. I.; NAKAGHI, S. O.; SOUZA, J. P.; DACRUZ, C.; DE OLIVEIRA, G. H.; URBINATI, E. C. Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon. **Journal Applied Ichthyology**, v. 25, p. 124-127, 2009.
- 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*. **Environ. Res. A.** v. 88, p. 52-63, 2002.
- MELO, K. M.; OLIVEIRA, R.; GRISOLIA, C. K.; DOMINGUES, I.; PIECZARKA, J. C.; SOUZA FILHO, J.; NAGAMACHI, C. Y. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. **Environmental Science and Pollution Research**. DOI 10.1007/s11356-015-4596-2, 2015.
- MPA. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Aquicultura: Produção Aquícola no Brasil**. 2013. Disponível em: < <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao>>. Acesso em fevereiro de 2014.
- MITTAL, A. K.; UEDA, T.; FUJIMORI, O.; YAMADA, K. Histochemical analysis of glycoproteins in the unicellular glands in the epidermis of na Indian freshwater fish, *Mastacembelus pancalus* (Hamilton). **Histochemical Journal**, v. 26, p. 666-677, 1994.
- MONTEIRO, S.M.; MANCERA, J.M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; SOUSA M. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.141, p.375-383, 2005.
- MORAES, J. C. **Efeitos do Thiodan® (endosulfan) nas brânquias de *Astyanax aff. bimaculatus***. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- MORAIS, A. C. T. **Concentração de metais pesados em peixes teleósteos do rio Piracicaba, Minas Gerais, Brasil**. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- MORGAN, M. & P. W. A. TOVELL. 1973. The structure of gill of the trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Zellforsch Mikrosk Anatomic*, 142: 147-162.
- MORON, S. E.; OBA, E. T.; ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Chloride cells responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 278A, p. 93-104, 2003.
- MORON, S. E., OBA, E. T., ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Chloride cells responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. **Journal Experimental Zoology**, v. 278 A, p. 93-104, 2003.
- NEBEKER, A.V.; MCKINNEY, P.; CAIRNS, M. A. Acute and chronic effects of Diflubenzuron (Dimilin) on freshwater fish and invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 2, p. 329-336, 1983.
- NERO, V., FARWELL, A., LISTER, A., VAN DER KRAAK, G., LEE, L.E.J., VAN MEER, T., MACKINNON, M.D., DIXON, D.G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 63, p. 365-377, 2006.

- NINMO, D. R. Pesticidas. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisphere, p. 335-373, 1985.
- NUNES, L. R. **Toxicidade aguda e efeito subletal do Roundup Transorb® nos testículos de matogrosso *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882) (Teleostei: Characidae)**. 2011. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- NUNES, B.; ANTUNES, S. C.; GOMES, R.; CAMPOS, J. C.; BRAGA, M. R.; RAMOS, A. S.; CORREIA, A. T. Acute Effects of Tetracycline Exposure in the Freshwater Fish *Gambusia holbrooki*: Antioxidant Effects, Neurotoxicity and Histological Alterations. **Archives of Environmental Contaminant and Toxicology**, v. 68, p. 371-381, 2015.
- OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT). Guidelines for Testing Chemicals - Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. Guideline 204. 9p. 1984.
- OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT). Guidelines for Testing Chemicals – Fish, Acute Toxicity Test. Guideline 203. 9p. 1992.
- OLIVEIRA, L. L. D. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 2014. 279 f. Dissertação (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2014.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; FANTA, E.; TURCATTI, N. M.; CARDOSO, R. J.; CARVALHO, C. S. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissues of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces; Siluroidei). **Biocell**. V. 20, p. 171-178, 1996.
- OSTASZEWSKA, T.; CHOJNACKI, M.; KAMASZEWSKI, M.; SAWOSZ-CHWALIBÓG, E. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. **Environmental Science and Pollution Research**, DOI: 10.1007/s11356-015-5391-9, 2015.
- OSTRENSKI, A.; CHAVES, P. T. C.; DUBOC, L. F.; GUIMARÃES, A. T. B.; CRUZ, S. R. Z.; WEGBECHER, F. X.; PILCHOWSKI, R. W.; TEIXEIRA, U. A.; BELZ, C. E. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigui e Iguacu. 2001. In: UNREPAR/PETROBRÁS. **II Seminário do Rio Iguacu**, p.32–52, 2001.
- OVERSTREET, R. M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. **Aquatic Toxicology**, v. 11, p. 213-239, 1988.
- PAULINO, M. G.; SOUZA N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 6-13, 2012.
- PEAKALL, D.W. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. **Toxicology Ecotoxicology News**, v.1, p.55-60, 1992.
- PELLI, A.; PAULA, D. R.; ARRUDA, A. A. M.; LOPES, J. M.; RAMOS, S. M.; REZENDE, A. P. S. Toxicidade aguda e crônica de diflubenzuron para o jaju, *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821) (Pisces, Pimelodidae). **Zoociências**, v. 10, 51-54, 2008.
- PERRY, S.F., WOOD, C.M., (1985). Control and coordination of gas transfer in fishes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 2961 – 2970.
- PESCE, S. F.; CAZENAVE, J.; MONFERRÁN, M. V.; FREDE, S.; WUNDERLIN, D. A. Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: *Corydoras paleatus* and *Jenynsia multidentata*. **Environmental Pollution**, V. 156, P. 775-783, 2008.
- PESSOA, M. C. P. Y.; GOMES, M. A. F.; NEVES, M. C.; CERDEIRA, A. L.; SOUZA, M. D. Identificação de áreas de exposição ao risco de contaminação de águas subterrâneas pelos herbicidas atrazina, diuron e tebutiuron. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.111-122, 2003.
- PERRY, S. F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 325-347, 1997.

- PIGNATI, WA; MACHADO, JMH. O agronegócio e seus impactos na saúde dos trabalhadores e da população do estado de Mato Grosso. In: GOMEZ, CM; MACHADO, JMH; PENA PGL (orgs.). **Saúde do trabalhador na sociedade brasileira contemporânea**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2011.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. (Eds) **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. FAO, Fishing News Books, Oxford, p.339-352, 1994.
- PROCÓPIO, M. S.; RIBEIRO, H. J.; PEREIRA, L. A.; LOPES, G.; A. O.; CASTRO, A. C. S.; RIZZO, E.; SATO, Y.; RUSSO, R. C. Sex-response differences of immunological and histopathological biomarkers in gill of *Prochilodus argenteus* from a polluted river in southeast Brazil. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, p. 108–117, 2014.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application**. London: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; RODRIGUES, E.L.; EIRAS, A.C.; VEIGA, M.L.; PACHECO, F.J. Alterações hematológicas em curimatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (trichlorfon). **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, v.24, p.187-196. 1997.
- RASKOVIC´, B.; POLEKSIC´, V.; VISNJIC´-JEFTIC´, Z.; SKORIC´, S.; GACIC´, Z.; DJIKANOVIC´, V.; JARIC´, I.; LENHARDT, M. Use of histopathology and elemental accumulation in different organs of two benthophagous fish species as indicators of river pollution. **Environmental Toxicology**, DOI: 10.1002/tox.21988, 2014.
- REISER, S.; SCHROEDER, J. P. WUERTZ, S.; KLOAS, W.; HANEL, R. Histological and physiological alterations in juvenile turbot (*Psetta maxima*, L.) exposed to sublethal concentrations of ozone-produced oxidants in ozonated seawater. **Aquaculture**, V. 307, P. 157–164, 2010.
- RONCERO, V.; VICENTE, J. A.; REDONDO, E.; GAZQUEZ, A.; DURAN, E. Experimental lead nitrate poisoning: Microscopic and ultrastructural study of the gills of tench (*Tinca tinca*, L.). **Environmental Health Perspectives**, v.89, p.137-144, 1990.
- ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaton® em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei)**. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- SAMANTA, P.; BANDYOPADHYAY, N.; PAL, S.; MUKHERJEE, A. K.; GHOSH, A. R. Histopathological and ultramicroscopical changes in gill, liver and kidney of *Anabas testudineus* (Bloch) after chronic intoxication of almix (metsulfuron methyl 10.1% + chlorimuron ethyl 10.1%) herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, V. 122, P. 360-367, 2015.
- SANTOS, D. M. S.; MELO, M. R. S.; MENDES, D. C. S.; ROCHA, I. K. B. S.; SILVA, J. P. L.; CANTANHÊDE, S. M.; MELETTI, P. C. Histological Changes in Gills of Two Fish Species as Indicators of Water Quality in Jansen Lagoon (São Luís, Maranhão State, Brazil). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, 12927-12937, 2014.
- SARAIVA, A., 2006. Aspectos gerais de histologia e de histopatologia de peixes. In: SILVA-SOUZA, A.T. (org) *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Maringá, 2006. p.239-252.
- SCHALCH, S. H. C.; BELO, M. A. A.; SOARES, V. E.; ENGRÁCIA DE MORAES, J. R.; RUAS DE MORAES, F. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Scientiarum. Biological Science**, v. 27, p. 297-302, 2005.
- SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 4. ed. Sao Paulo: Sarvier, p. 269-279, 1991.
- SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 231-240, 2001.
- SCHWAIGER, J. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

- SHIOGIRI, N. S.; PAULINO, M. G.; CARRASCHI, S. P.; BARALDI, F. G.; CRUZ, C.; FERNANDES, M. N. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 34, p. 388-396, 2012.
- SILVA, A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática**. 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Área de Concentração Zoologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2004.
- SILVA FILHO, P. B. **Efeitos Roundup™ e do Thiodan® em adultos de *Astyanax bimaculatus* (Characidae: Teleostei): valores de CL₅₀ e morfologia testicular**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.
- SINDAG – SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 2012. In: Dossiê ABRASCO: **Uma alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de Janeiro/São Paulo, 2015. 628p.
- SKIDMORE, J. F.; TOVELL, P. W. A. Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. *Water Research*, v.6, p.271-230, 1972.
- SONNE, C.; BACH, L.; Søndergaard, J.; RIGÉT, F. F.; DIETZ, R.; MOSBECH, A.; LEIFSSON, P. S.; GUSTAVSON, K. Evaluation of the use of common sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) organ histology as bioindicator for elemento exposure in the fjord of the mining área Maarmorilik, West Greenland. **Environmental Research**, V. 133, P. 304-311, 2014.
- SOUSA, T. F. C. W. L. **Manejo do solo e qualidade da água no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro**. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.
- SOUZA, J, P. **Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Pocilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.
- STENTIFORD, G. D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B. P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S. W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v.55, p.137–159, 2003.
- STEPHAN, C. E.; MOUNT, D. I. Use of toxicity tests with fish in water pollution control, p. 164-175, 1973. In: **Biological Methods for the Assessment of Water Quality**, ASTM International, STP 528. American Society Testing and Materials. Philadelphia, Pa., 254 p., 1973.
- SWANN, L. **A Fish Farmer's Guide to Understanding Water Quality**. Department of Animal Sciences. Illinois-Indiana Sea Grant Program Purdue University. 2008. Disponível em: <<http://aquanic.org/publicat/state/il-in/as-503.htm>> Acesso em maio 2014.
- TAGLIAFERRO, A. F. **Avaliação da toxicidade aguda do inseticida endossulfan em alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), com o emprego de biomarcadores histológicos**. 2009. 147f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.
- TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51-70, 1997.
- 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.
- TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **O Biológico**, v.64, p.135-142, 2002.
- TOMLIN, C. D. S. **The Pesticida manual. A Word compendium**. British Crop Protection Council, 11 Ed. 1606p., 1997.
- USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Prevention pesticides and toxic substances**. 1997. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reds/factsheets/0144fact.pdf>. Acesso em: 20 Jan. 2015.

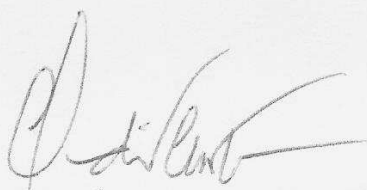
- USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Technical Support Document for Water Quality-Based Toxic Control**. EPA-Washington D.C., 135 p. 1984.
- VAN HEERDEN, D.; VOSLOO, A.; NIKINMAA, M. Effects of short-term copper exposure on gill structure, methallothionein and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, v.69, p.271-280, 2004.
- WEITZMAN, S. H.; PALMER, L. The common serpa tetra of aquarists, identified as *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882). **Tropical Fish Hobbyist**, v. 45 p.140-150, 1997.
- WENDELAAR BONGA, S. E.; VAN DER MEIJ, C. J. Degeneration and death, by apoptosis and necrosis the pavement and cells the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. **Cell Tissue Research**, v. 255, p. 235-243, 1989.
- WINKALER, E. U.; SILVA, A. G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. dos R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.
- WONG, C. K.; WONG, M. H. 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*) to ambiente cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, 48: 517-527. In: **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Empraba Amapá, cap. 23, p. 602-634, 2009.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2006.

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo n.º 56/2013, intitulado “*Efeitos do inseticida Dimilin® na morfologia de brânquias do peixe *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882)*”, coordenado pelo professor, Laércio dos Anjos Benjamin do Departamento de Veterinária, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 26/09/2013, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 56/2013, named “*Effects of diflubenzuron on gill morphology of the fish *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882)*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Laboratory of Animals (SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on September 26, 2013 approved this process. This certificate expire in 12 months.



Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV