

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**Efeitos da exposição ao inseticida diflubenzuron em
curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo,
Prochilodontidae)**

Tayrine Paschoaletti Benze

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marisa Narciso Fernandes

São Carlos, SP
2013

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Efeitos da exposição ao inseticida diflubenzuron em curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae)

Tayrine Paschoaletti Benze

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos, SP
2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B479ee Benze, Tayrine Paschoaletti.
Efeitos da exposição ao inseticida diflubenzuron em curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae) / Tayrine Paschoaletti Benze. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
71 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Ecologia aquática. 2. Ecotoxicologia. 3. *Prochilodus lineatus*. 4. Diflubenzuron. 5. Alterações histopatológicas. 6. Monitoramento ambiental. I. Título.

CDD: 574.5263 (20^a)

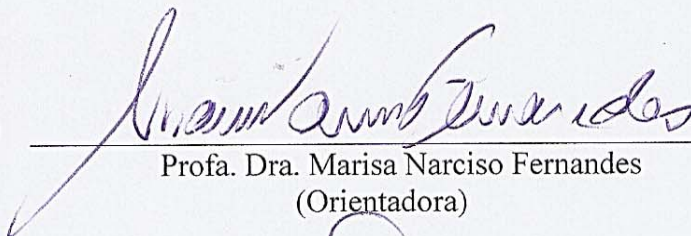
Tayrine Pachoaletti Benze

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 28 de junho de 2013

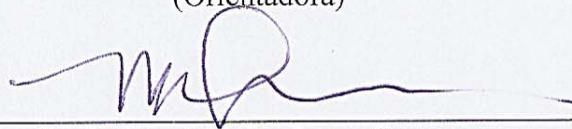
BANCA EXAMINADORA

Presidente



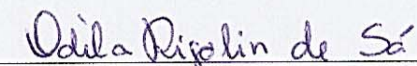
Prof. Dra. Marisa Narciso Fernandes
(Orientadora)

1º Examinador



Prof. Dra. Mônica Jones Costa
PPGMBA/UFSCar

2º Examinador



Prof. Dra. Odila Rigolin de Sá
FESP/UEMG/Passos-MG

À minha família

Agradecimentos

A Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pela orientação, incentivo, ensinamentos e confiança.

Aos membros da banca examinadora.

Ao Profa. Dra. Marise Margareth Sakuragui pelo apoio imprescindível durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A Helen Sadauskas Henrique, pela grande amizade e grande ajuda no desenvolvimento do trabalho. Ao Prof. Dr. Wallice pela amizade, parceria e pelo auxílio durante a escrita do trabalho. A Lucas Zago pelo auxílio e dedicação durante o desenvolvimento do trabalho.

A todos os amigos, pesquisadores e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, pela amizade, auxílio e convívio.

Agradeço especialmente ao CNPq/INCT-TA, FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro e ao CNPq pela bolsa recebida durante o desenvolvimento do projeto.

A toda minha família, especialmente aos meus avós, pelo incentivo e ajuda indispensável para que esse trabalho fosse possível, e por me apoiar sempre em minhas escolhas.

Ao meu namorado, pelo carinho e por estar ao meu lado incentivando e apoiando sempre.

Aos amigos queridos, pela amizade, pelos momentos divertidos e descontraídos, por estarem sempre do meu lado.

Enfim, agradeço a todos que participaram de alguma forma neste trabalho e principalmente às pessoas que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. Aos que esqueci de agradecer, peço perdão e sintam-se reconhecidos. Muito obrigada de coração.

Sumário

1	Introdução.....	10
1.1	Contaminação ambiental.....	10
1.1.1	Inseticida diflubenzuron.....	12
1.2	O uso de peixes no monitoramento ambiental.....	15
1.3	Biomarcadores em peixes.....	17
1.3.1	Biomarcadores bioquímicos.....	19
1.3.2	Biomarcadores genotóxicos e fisiológicos.....	22
1.3.4	Biomarcadores morfológicos.....	24
1.4	O peixe neotropical <i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1847).....	25
1.5	Justificativa do estudo e hipótese.....	26
1.6	Objetivos.....	27
1.6.1	Objetivo geral.....	27
1.6.2	Objetivos específicos.....	27
2	Materiais e métodos.....	28
2.1	Desenho experimental.....	29
2.2	Análise comportamental dos peixes expostos ao inseticida Dimilin®.....	30
2.3	Análises genéticas, bioquímicas e morfológicas.....	31
2.3.1	Micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocíticas.....	31
2.3.2	Peroxidação lipídica.....	31
2.3.3	Histopatologias das brânquias e fígado.....	32
2.3.4	Análise dos íons plasmáticos e osmolaridade.....	34
2.3.5	Atividade das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) e H⁺-ATPase branquial....	35
2.3.6	Atividade da enzima anidrase carbônica.....	36
2.4	Análise estatística.....	36
3	Resultados.....	37
3.1	Análise comportamental dos peixes expostos ao inseticida Dimilin®.....	37
3.2	Micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE).....	37
3.3	Lipoperoxidação das brânquias e fígado.....	39
3.4	Histopatologia das brânquias de <i>P. lineatus</i>.....	40
3.5	Histopatologia do fígado de <i>P. lineatus</i>.....	43
3.6	Análise dos íons plasmáticos e osmolaridade.....	46
3.7	Atividade das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) e H⁺-ATPase branquial.....	48
3.8	Atividade da enzima anidrase carbônica.....	50
4	Discussão.....	51
	Conclusão.....	59
	Considerações Finais.....	59
	Referências Bibliográficas.....	60

Lista de figuras

Figura 1. Rota dos agrotóxicos no ambiente.....	10
Figura 2. Dimilin® produto comercial.....	14
Figura 3. Exemplar de um jovem da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	26
Figura 4. Anormalidades nucleares e micronúcleos no sangue de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. Em A: núcleo segmentado; em B: núcleo lobulado; em C: núcleo em formato de rim e em D: micronúcleos.....	38
Figura 5. Frequência das alterações nucleares eritrocíticas – ANE (núcleo segmentado, núcleo lobulado, núcleo em formato de rim e micronúcleos) em <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa (P≤0,05) em relação ao controle (00 mg L ⁻¹).....	39
Figura 6. Lipoperoxidação das brânquias (A) e fígado (B), em <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa (P≤0,05) em relação ao controle (0 mg L ⁻¹).....	40
Figura 7. Alterações histopatológicas mais frequentes nas brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. Em A: tecido relativamente sem alterações; B: Hipertrofia do epitélio lamelar; C: dilatação do canal marginal; D: hiperplasia do epitélio do filamento; E: descolamento epitelial; F: proliferação de células cloreto.....	41
Figura 8. Brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. A. valor médio de alteração (VMA); B. Índice de alteração histopatológica (IAH). (*) indica diferença significativa (P≤0,05) em relação ao controle (00 mg L ⁻¹).....	43
Figura 9. Alterações histopatológicas mais frequentes no fígado de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. Em A: tecido relativamente sem alterações; B: desarranjo dos cordões hepáticos; C: grânulos eosinófilos; D: vacuolização nuclear; E: degeneração nuclear.....	44
Figura 10. Fígado de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. Em A: valor médio de alteração histopatológica (VMA). Em B: índice de alteração histopatológica (IAH). (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L ⁻¹).....	46
Figura 11. Osmolaridade total do plasma de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L ⁻¹).....	46
Figura 12. Concentração do íon Na no plasma de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias.....	47
Figura 13. Concentração do íon K no plasma de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias.....	47
Figura 14. Concentração do íon Cl ⁻ no plasma de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L ⁻¹).....	48
Figura 15. Atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ - ATPase nas brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias.....	49
Figura 16. Atividade da H ⁺ - ATPase nas brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L ⁻¹).....	49

Figura 17. Atividade da anidrase carbônica nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimlin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L⁻¹).....50

Lista de tabelas

Tabela 1. Doses de Dimilin® utilizadas em diferentes culturas agrícolas.....	14
Tabela 2. Comprimento total e parcial dos peixes. Os dados são apresentados como média±erro padrão da média.....	29
Tabela 3. Mensurações das variáveis da água. Os dados são apresentados como média±erro padrão da média.....	29
Tabela 4. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função branquial.....	33
Tabela 5. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função hepática.....	34
Tabela 6. Frequência das alterações nucleares eritrocíticas - ANE (núcleo segmentado, núcleo lobulado, núcleo em formato de rim e micronúcleos) em <i>P. lineatus</i> expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. Os dados são apresentados como média±erro padrão da média. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L ⁻¹).....	38
Tabela 7. Avaliação qualitativa da frequência das alterações histopatológicas nas brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. Em 0 = ausente; 0+ = raramente frequente; + = frequente; ++ = muito frequente; +++ = extremamente frequente.....	42
Tabela 8. Avaliação qualitativa da frequência das alterações histopatológicas no fígado de <i>Prochilodus lineatus</i> , expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L ⁻¹) durante 14 dias. Em 0 = ausente; 0+ = raramente frequente; + = frequente; ++ = muito frequente; +++ = extremamente frequente.....	45

Resumo

O diflubenzuron (DFB), comercializado com o nome de Dimilin® (CHEMTURA), tem sido intensivamente utilizado em aquicultura e aplicações agrícolas podendo ocorrer contaminação do ambiente aquático. *Prochilodus lineatus* foi exposto a 0,0, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de DFB durante 14 dias e, em seguida, foram determinadas a frequência de anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) e micronúcleos (MN) no sangue, a peroxidação lipídica (LPO) nas brânquias e fígado, histopatologias das brânquias e fígado, osmolaridade total e concentração dos íons plasmáticos, a atividade das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) e H⁺-ATPase nas brânquias e a atividade da anidrase carbônica (AC) nas brânquias. As ANE mais frequentes foram o núcleo em formato de rim e micronúcleo e aumentaram significativamente nos grupos expostos a 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de DFB. A concentração de LPO nas brânquias diminuiu nos animais expostos a 2,0 mg L⁻¹ de DFB e no fígado ocorreu um aumento nos animais expostos a 0,5 e 2,0 mg L⁻¹. O índice de alteração histopatológico nas brânquias (IAH) foi maior nos grupos expostos a 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de DFB. No fígado, o valor médio de alteração (VMA) e o IAH aumentaram nos grupos expostos a 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de DFB. A osmolaridade total do plasma aumentou de forma significativa no grupo exposto a 0,5 mg L⁻¹ de Dimilin®, em relação ao íon Cl⁻, houve uma diminuição significativa de sua concentração no grupo exposto a 2,0 mg L⁻¹. A atividade da H⁺ - ATPase demonstrou um aumento no grupo 1,0 mg L⁻¹. A AC diminuiu significativamente no grupo exposto a 2,0 mg L⁻¹. O Dimilin® apresenta potencial tóxico para *P. lineatus*, causando alterações genotóxicas e mutagênicas, assim como alterações morfofuncionais nas brânquias e fígado, e pode ser monitorado através das técnicas experimentais utilizadas no presente trabalho.

Abstract

The diflubenzuron (DFB), sold under the name Dimilin® (CHEMTURA), has been extensively used in aquaculture and agricultural applications may occur contamination of the aquatic environment. *Prochilodus lineatus* was exposed to 0.0, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ DFB for 14 days and then were determined frequency erythrocytic nuclear abnormalities (ANE), and micronuclei (MN) in the blood, lipid peroxidation (LPO) in the gills and liver, histopathology of gills and liver, total osmolarity and concentration of plasma ions, the activity of the enzymes Na⁺/k⁺-ATPase (NKA) and H⁺-ATPase in the gills and the activity of carbonic anhydrase (AC) in the gills. The most frequent ENA were the kidney-shaped nucleus and micronucleus and increased significantly in the groups exposed to 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ DFB. The LPO concentration in the gills reduced in animals exposed to 2.0 mg L⁻¹ DFB and in the liver there was an increase in the animals exposed to 0.5 and 2.0 mg L⁻¹. The degree of tissue change (IAH), in the gills was higher in the groups exposed to 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ DFB. In the liver, the average change (VMA) and IAH increased in the groups exposed to 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ DFB. The total plasma osmolarity increased significantly in the group exposed to 0.5 mg L⁻¹ Dimilin®, for the Cl⁻ ion, there was a significant decrease of its concentration in the group exposed to 2.0 mg L⁻¹. The activity of H⁺-ATPase showed an increase in group 1.0 mg L⁻¹. The AC decreased significantly in the group exposed to 2.0 mg L⁻¹. The Dimilin® has potential toxic to *P. lineatus*, causing genotoxic and mutagênica changes as well as changes morphofunctional in gills and liver, and can be monitored through the experimental techniques used in this work.

1 Introdução

1.1 Contaminação ambiental

Nos últimos anos a quantidade de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vem aumentando de forma alarmante através da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Tal fato tem contribuído para a redução da qualidade ambiental, e comprometido a saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas. Um exemplo é o uso intensivo de pesticidas nas lavouras, que leva à contaminação dos ambientes aquáticos. Esses produtos, quando aplicados na agricultura, podem atingir os corpos d'água, principalmente carreados pelo escoamento superficial através das águas das chuvas.

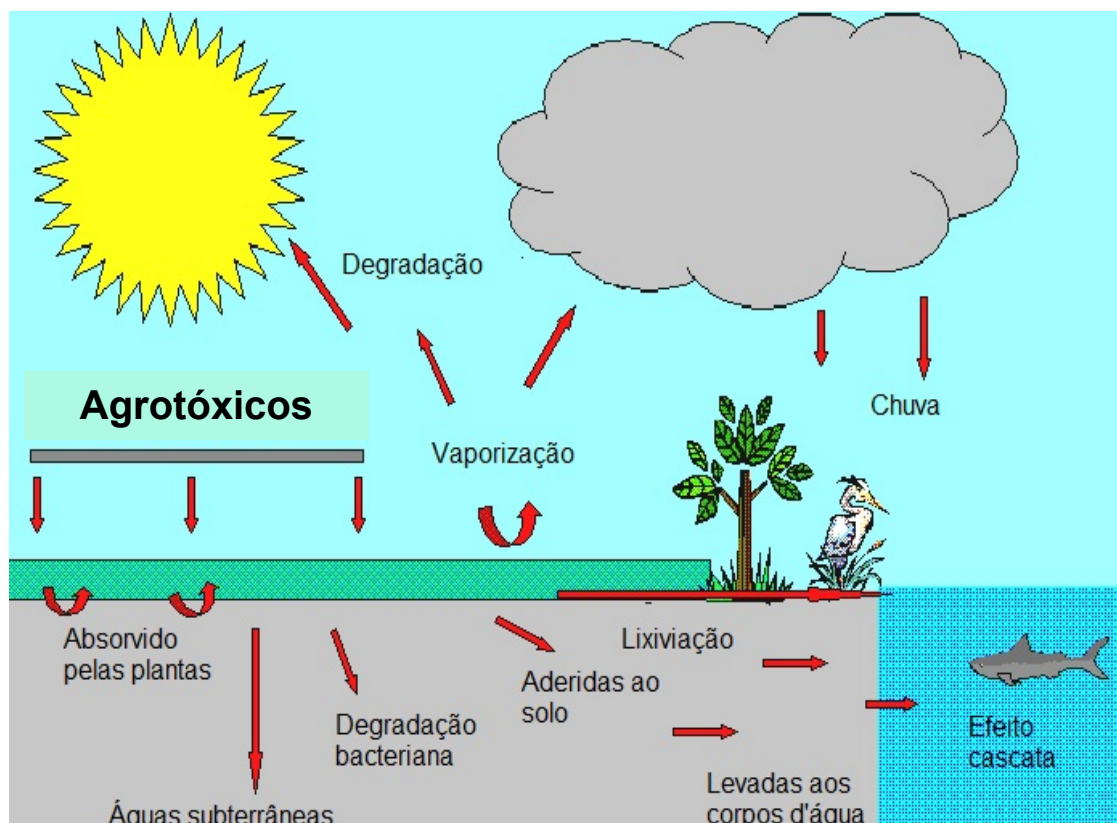


Figura 1. Rotas dos agrotóxicos no ambiente.

Outro problema é encontrado em pisciculturas. Como os peixes podem enfrentar problemas com parasitoses que causam danos à saúde e prejuízos de ordem econômica, a aplicação de produtos químicos é a primeira estratégia para o combate de ectoparasitos de peixes. Os parasitas dos gêneros *Ergasilus sp*, *Lernaea sp*, *Lepeophtheirus sp* e *Argulus sp*, afetam a reprodução dos peixes infectados, provocam deficiências na conversão de alimentos, são vetores de bactérias e vírus e ainda provocam infecções secundárias por fungos que podem levar a morte dos organismos parasitados. Frequentemente, o controle desses organismos danosos aos animais de cultivo é feito por meio da utilização de quimioterápicos em banhos terapêuticos, rações medicadas e aplicação de vacinas (SCHOLZ, 1999; DAVIES et al., 2001). Entretanto, a falta de informações e produtos químicos próprios para a aquicultura, leva ao uso indiscriminado de pesticidas, com formulações que são próprias para a agropecuária gerando dessa forma, efluentes que comprometem a qualidade da água, colocando em risco a biota aquática (MADUENHO e MARTINEZ et al., 2008).

O grande problema da utilização desses produtos químicos tóxicos está relacionado aos possíveis impactos negativos que podem provocar quando atingem espécies sensíveis e não-alvos nos ambientes aquáticos. Além disso, o ecossistema aquático é constantemente perturbado também por poluentes tóxicos das mais variadas fontes. Os lixiviados de áreas agrícolas, os crescentes despejos de esgotos domésticos e industriais e a liberação dos efluentes das pisciculturas, contribuem significativamente para modificações ambientais; reduzem a diversidade de espécies autóctones e aumentam desordenadamente a densidade de determinadas espécies indesejáveis (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

1.1.1 Inseticida diflubenzuron (Chemtura)

O inseticida diflubenzuron (DFB), comercializado com o nome de Dimilin® (CHEMTURA INDÚSTRIA QUÍMICA DO BRASIL LTDA), 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 resultados satisfatórios no controle de ectoparasitoses e por se acreditar que este produto tenha baixa toxicidade para peixes segundo alguns estudos (FUJIMOTO et al., 1999). Este produto é muito utilizado para o controle de *Odonata* durante a larvicultura e de ectoparasitos como os do gênero *Dolops* e *Lernaea* (FUJIMOTO et al., 1999; SCHALCH et al., 2005; MABILIA e SOUZA, 2006; PELLI et al., 2008).

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). A cutícula mal formada do novo instar do inseto, não suporta a pressão interna durante a ecdise e/ou não consegue dar suficiente suporte aos músculos envolvidos. Isso resulta numa incapacidade em liberar a exúvia e finalmente conduz a morte das larvas. O diflubenzuron atua principalmente por ação de ingestão. O composto não tem efeito sistêmico nas plantas e não penetra nos tecidos vegetais. Consequentemente, insetos sugadores não são afetados: essas características formam a base de uma seletividade adicional entre os insetos. Nos últimos anos, o DFB vem sendo utilizado, no Brasil, no controle do mosquito *Aedes aegyptis*, causador da dengue, devido à resistência do mosquito a pesticidas como os organofosforados e piretróides utilizados no controle do indivíduo adulto (BRAGA 2004; BORGES et al., 2012)

O DFB é frequentemente usado em pisciculturas com eficácia nas concentrações que variam entre 0,5 a 2 mg.L⁻¹ (FUJIMOTO et al., 1999). Porém, alguns trabalhos ressaltam que essas doses podem ser letais para populações zooplanctônicas, principalmente aquelas que apresentam exoesqueleto quitinoso, como as de invertebrados de água doce, crustáceos marinhos e estuarinos. Alguns autores recomendam o não uso do DFB em aquicultura devido ao risco que pode oferecer a esses organismos (SCHOLZ, 1999). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1997) classificou o DFB como um produto de uso restrito devido à falta de informações sobre os efeitos que pode causar sobre invertebrados aquáticos. Em relação a vertebrados aquáticos, como peixes, há poucas informações sobre os efeitos que este inseticida pode causar.

Doses que variam entre 0,5 a 2 mg.L⁻¹ (SCHALCH, et al., 2005; FUJIMOTO et al., 1999) podem alterar as populações zooplanctônicas (LUDWIG, 1993; FUJIMOTO et al., 1999) e, indiretamente, interferir no desenvolvimento de organismos que utilizam essas populações como alimento.

Em peixes, estudos reportam que a toxicidade aguda, ou seja, a determinação da concentração letal após 96 h de exposição ao DFB (CL₅₀;96h) pode ser maior que 50 mg L⁻¹ (FISHER e HALL, 1992; PELLI et al., 2008). A exposição de *Prochilodus lineatus* a concentração de 25 mg L⁻¹ de Dimilin® (DFB) causa alterações hematológicas, metabólicas e a ativação das rotas de metabolização de xenobióticos e defesas antioxidantes (MADUENHO e MARTINEZ, 2008). As concentrações consideradas terapêuticas utilizadas em pisciculturas variam entre 0,5 a 2 mg L⁻¹ (FUJIMOTO et al., 1999) e a maioria dos estudos expõem os peixes ao DFB repetitivamente durante curtos períodos de tempo (MABILIA e SOUZA, 2006; PELLI et al., 2008). Exposições subletais, porém crônicas, podem ocorrer devido ao aporte

contínuo nos ecossistemas aquáticos e ao acúmulo do inseticida no sedimento que, dependendo das condições ambientais, resulta em realocação deste inseticida na coluna d' água.

A composição química do DFB, encontrada na embalagem do produto comercial (Dimilin®) (Figura 1), é 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea. Apresentando 25% do princípio ativo diflubenzuron e 75% de ingredientes inertes. O produto comercial é utilizado na agricultura em diversas culturas (Tabela I).

Tabela 1. Doses de Dimilin® utilizadas em diferentes culturas agrícolas.

CULTURA	PRAGA CONTROLADA		DOSE			
	Nome científico	Nome comum	g/ha	g.i.a./ha	g/100 L de água	VOLUME DE CALDA (L/ha)*
Algodão	<i>Alabama argillacea</i>	Curuquerê	60	15		150
Citros	<i>Ecdytolopha aurantiana</i>	Bicho furão	500	125	25	2000
Milho	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Lagarta do cartucho	100	25		200-400
Soja	<i>Anticarsia gemmatilis</i>	Lagarta da soja	30-60	7,5-15		150
	<i>Pseudoplusia includens</i>	Lagarta- falsa-medideira	140	35		
Tomate	<i>Tuta absoluta</i>	Traça do tomateiro	500	125	50	1000
	<i>Helicoverpa zea</i>	Broca grande do tomateiro				
	<i>Neoleucinodes elegantalis</i>	Broca pequena do tomateiro				
	<i>Phthonimaea operculella</i>	Traça da batatinha				
Trigo	<i>Pseudaletia sequax</i>	Lagarta do trigo	100	25		150
<i>Rhammatocerus spp</i>		Gafanhoto	100	25		150-200
<i>Rhammatocerus schistocercoides</i>		Gafanhoto				

Fonte: Chemtura Indústria Química do Brasil Ltda



Figura 2. Dimilin® produto comercial da Chemtura, Indústria Química do Brasil Ltda.

O DFB, na classificação do Ministério da Agricultura, é enquadrado na classe toxicológica III – Medianamente tóxico; II – Muito perigoso ao meio ambiente, altamente persistente no meio ambiente e altamente tóxico para crustáceos. O Dimilin®, segundo a EPA (2006) está classificado como classe toxicológica IV – baixa toxicidade.

Estudos realizados com animais de laboratórios (ratos) expostos a doses que variaram de 156 mg L⁻¹ à 10.000 mg L⁻¹ de DFB, foi observado redução no ganho de massa corpórea das fêmeas submetidas as doses mais altas assim como redução no nível de hemoglobina do sangue de machos e fêmeas, após um ano de teste, nos tratamentos a partir de 625 mg L⁻¹, segundo dados registrados na bula do produto da marca Chemtura, Indústria Química do Brasil Ltda.

Dessa forma, o uso indiscriminado desse pesticida na agricultura, no controle do *A. aegypti* e piscicultura podem levar a contaminação dos ecossistemas aquáticos e comprometer a qualidade da água, colocando em risco a biota aquática (MADUENHO e MARTINEZ, 2008).

1.2 O uso de peixes no monitoramento ambiental

Atualmente, muitos programas de monitoramento ambiental aquático têm utilizado vertebrados aquáticos, como peixes, como bioindicadores para avaliação da qualidade da água. O interesse no uso de bioindicadores no monitoramento aumentou acentuadamente na última década pelo fato de estarem, em geral, no topo da cadeia trófica nesses ambientes (ADAMS, 2002). Esses animais são sensíveis às alterações no ambiente e suas respostas biológicas podem ser iniciadas até mesmo quando as concentrações de substâncias químicas estão abaixo do limite de detecção dos métodos analíticos disponíveis, ou após a exposição química ter ocorrido.

O uso dos peixes não se restringe apenas na avaliação do número e abundância de espécies no ambiente, mas uma análise detalhada das condições de saúde da espécie via biomarcadores (MACHADO, 1999). A toxicidade de agentes químicos no meio hídrico pode ser avaliada através de ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos da coluna d'água ou através dos sedimentos dos ambientes em questão. Esses ensaios podem ter diversas finalidades, como calcular a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos e outros; instituir critérios e padrões de qualidade das águas; estabelecer limites máximos de lançamento de efluentes líquidos em corpos hídricos; analisar a necessidade de tratamento de efluentes líquidos quanto às exigências de controle ambiental; avaliar a qualidade das águas; comparar a toxicidade relativa de diferentes substâncias; avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos; auxiliar programas de monitoramento ambiental, estimar os impactos provocados em acidentes ambientais (RAND e PETROCELLI, 1985).

Diversos organismos aquáticos desenvolveram mecanismos para diminuir os efeitos nocivos dos compostos químicos assim que eles forem ingeridos ou absorvidos. Tais mecanismos modificam a estrutura química do poluente através da ação de enzimas (proteínas que conseguem "quebrar" alguns compostos químicos), para tentar torná-lo mais solúvel e menos tóxico ao organismo. Quanto mais solúvel o composto, mais facilmente o organismo irá eliminá-lo, via urina ou suor, por exemplo. Os principais órgãos responsáveis pela metabolização dos compostos são os rins e o fígado.

A fisiocologia é uma ferramenta muito importante nesses casos, pois avalia os tipos de respostas fisiológicas, nas quais, em seu contexto, estão envolvidas respostas bioquímicas e morfológicas que os organismos possuem em função da adaptação a condições adversas encontradas no meio aquático. Biomarcadores podem ser definidos

como respostas biológicas que podem estar relacionadas à exposição ou ao efeito tóxico de um contaminante ambiental (PEAKALL, 1994). O uso de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos como bioindicadores tem apresentado bons resultados na avaliação do efeito dos poluentes sobre os peixes (WINKALER et al., 2001).

Estes biomarcadores podem ser considerados como respostas primárias e secundárias ao estresse sofrido pelos organismos. O contato dos peixes com substâncias tóxicas leva a uma seqüência de respostas fisiológicas e morfológicas que afetam o funcionamento adequado do organismo e interferem na homeostasia interna de cada indivíduo, podendo ocasionar prejuízos nos processos naturais como a alimentação, recrutamento e comportamento, consideradas respostas terciárias a esse estresse (SADAUSKAS-HENRIQUE, 2010). Dessa forma, podemos avaliar a toxicidade de diversos poluentes em diferentes organismos através dos biomarcadores.

1.3 Biomarcadores em peixes

Um biomarcador pode ser considerado uma alteração bioquímica, fisiológica ou morfológica como consequência do contato de um organismo a um xenobiótico ou seu efeito (MELANCON, 1995). Como esses biomarcadores representam excelentes ferramentas para monitorar a saúde dos ecossistemas aquáticos, têm sido usados em programas modernos de monitoramento ambiental de países desenvolvidos, como por exemplo, em alguns países da Europa. Por serem sensíveis ao agente estressor ajudam rapidamente a identificar os mecanismos básicos da relação causal entre o estressor e seus efeitos (BAINY, 1993).

Em peixes, o xenobiótico ao entrar no organismo e é transportado via corrente sanguínea até os demais órgãos, onde é armazenado e metabolizado para posterior eliminação. Como a maioria dos pesticidas é lipofílica, eles atravessam as membranas causando danos aos componentes celulares. De forma que é importante que em um bioensaio ou biomonitoramento seja utilizado um conjunto de biomarcadores para ter uma visão mais ampla dos efeitos tóxicos de contaminantes no organismo estudado (HINTON et al., 1992). Nos peixes de água doce, os xenobióticos são, em geral, absorvidos principalmente pelas brânquias, devido ao grande volume de água que passa por elas para que ocorram as trocas gasosas, distribuídos no organismo, via circulação do sangue, e metabolizados no fígado que é o principal órgão de detoxificação do organismo (KÖHLER, et al., 1992; TEH et al., 1997; CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; MAZON et al., 2002; SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2010).

As brânquias dos peixes, as quais exercem funções vitais para a sobrevivência e/ou adaptação aos mais variados ambientes (MEYERS e HENDRICKS, 1985; FERNANDES et al. 2007), têm sido consideradas potenciais órgãos cuja integridade poderia ser utilizada como indicadores da qualidade da água (MACHADO, 1999). Esse órgão possui uma grande área de superfície de contato com o meio externo e tem um papel importante em inúmeras funções, incluindo respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de produtos nitrogenados (ALAZEMI et al., 1996; GRAYMORE et al., 2001; FERNANDES e MAZON, 2003). As brânquias são responsáveis pela transferência dos gases respiratórios e regulação osmo-ionica, a efetividade da sua função depende da atividade das enzimas relacionadas à absorção de íons (Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase e anidrase carbônica) e do estado íntegro das lamelas, considerando a espessura da barreira de difusão água-sangue, a magnitude da ventilação e o fluxo sanguíneo (SAKURAGUI et al., 2003). O fígado dos teleósteos é outro órgão

alvo de xenobióticos; sendo um órgão multifuncional, é responsável pela conversão do alimento, produção da vitelogenina durante o crescimento gonadal e desintoxicação de compostos estranhos.

Dessa forma, o uso de biomarcadores bioquímicos confere algumas vantagens, pois são normalmente os primeiros a serem detectados. Por serem muito sensíveis, apresentam alta especificidade, são de baixo custo e fornecem informações do efeito metabólico causado pelo xenobiótico (AMORIN, 2003).

1.3.1 Biomarcadores bioquímicos

O estresse oxidativo pode ser causado pela contaminação aquática, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos organismos expostos (AHMAD et al., 2000). O termo ERO também é utilizado para espécies que não são radicais livres, mas são capazes de gerar radicais livres, como no caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

O oxigênio (O_2) é uma molécula que pode ser parcialmente reduzida, formando vários agentes quimicamente reativos. Podendo formar, quando reduzido de forma incompleta, intermediários reativos como os radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), hidroperóxil (HO_2^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A atividade das enzimas antioxidantes em peixes, pode ser alterada devido ao aumento da produção de ERO durante o metabolismo de xenobióticos para neutralizar os efeitos desses radicais livres (VIARENGO et al., 1997). Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre produção de ERO e a atividades das enzimas antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo.

As ERO podem reagir com todas as biomoléculas celulares, alterando total ou parcialmente a sua função e afetando o metabolismo. Uma das principais lesões

causadas pelas ERO é a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular (HOGG e KALYANARAMAN, 1998). A LPO resulta em transtornos na permeabilidade, alteração do fluxo iônico, alteração da seletividade de nutrientes e posteriormente, levando ao rompimento da membrana ou mesmo quebra em moléculas menores, como determinados aldeídos, que por si só já são tóxicos para a célula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

A atividade das adenosinas trifosfatases (ATPases) também é um biomarcador sensível à toxicidade. Elas hidrolisam adenina trifosfato (ATP) em adenina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) (KULTZ e SOMERO, 1995). As ATPases são enzimas de membrana e possuem variadas formas, responsáveis pelo transporte de íons, volume celular, pressão osmótica e permeabilidade da membrana (AGRAHAHI e GOPAL, 2008).

A Na^+/K^+ -ATPase (NKA) tem importância na regulação da osmolaridade do corpo todo (ALAM e FRANKEL, 2006), a qual é promovida pelo transporte ativo de íons sódio e íons potássio através da membrana (BIANCHINI et al., 1999). Essa enzima é formada por três subunidades (α , β e γ), onde a α é catalítica, possui massa molecular de 100 kDa e possui sítios de ligação para o Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , ATP e oubaína. A subunidade β , é a menor e com massa molecular de 55 kDa, não possui sítio de ligação, assim como a γ , mas é importante pela inserção na membrana e localização da enzima (LIN et al., 2004; MORRISON et al., 2006). No transporte de íons, a enzima consiste em duas diferentes conformações, E1 (fosforilada) e E2 (desfosforilada). Na primeira, ela tem alta afinidade pelo Na^+ intracelular e na E2 tem alta afinidade pelo K^+ extracelular. A ciclagem entre E1 e E2 resulta no transporte de 3 íons sódio para fora da

célula e a entrada de 2 íons potássio, utilizando uma molécula de ATP e um íon Mg^{+2} como co-fator na fosforilação da enzima (HORISBERGER, 2004; MASSUI, 2005).

O gradiente iônico entre o meio externo e o fluido extracelular de peixes é mantido por células branquiais especializadas, as células-cloreto, as quais são caracterizadas pelos altos níveis de NKA (CHOE et al., 1999). A abundância e atividade da NKA nas brânquias podem ser alteradas quando a concentração de íons muda no ambiente aquático (THOMSON e SARGENT, 1977; EPSTEIN, 1980; SHIKANO e FUJIO, 1998). Os xenobióticos podem alterar a atividade da enzima por interrupção da produção de energia em vias metabólicas ou interagindo diretamente sobre a enzima (AGRAHARI e GOPAL, 2008). Dessa forma, a NKA pode ser utilizada de modo efetivo como um indicador da competência osmorregulatória (SHIKANO e FUJIO, 1998).

A H^{+} -ATPase, se trata de uma bomba eletrogênica ativa de prótons, ou H^{+} -translocação-ATPase. Uma bomba de prótons, indiretamente acoplada, com um canal condutor de sódio em vez de um trocador $Na^{+}/H^{+}(NH_4^{+})$, que é responsável pela absorção de íons sódio e excreção de prótons em peixes de água doce (LIN et al., 1994). Podendo dessa forma, também ser utilizada como um marcador bioquímico.

A anidrase carbônica (AC), uma metaloenzima, é responsável pela catálise da reação reversível de hidratação de CO_2 : $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^{+} + HCO_3^{-}$ (GILMOUR e PERRY, 2009). Nas brânquias, os íons gerados a partir do metabolismo são trocados na membrana apical do epitélio branquial, respectivamente, por Na^{+} e Cl^{-} , gerando a absorção do sal (EVANS et al., 2005). A AC localiza-se principalmente em regiões interlamelares e representa uma enzima solúvel (SENDER et al., 1999).

1.3.2 Biomarcadores genotóxicos e fisiológicos

O sangue é um dos primeiros tecidos a entrar em contato com os poluentes do meio, e ao ser distribuído entre os demais tecidos, estes também sofrerão distúrbios fisiológicos devido à exposição (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; MAZON et al., 2002; SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2010). O sangue é constituído basicamente de células e plasma, onde estão dissolvidos os gases, hormônios e íons responsáveis pela homeostasia do organismo (PAULINO, 2011). Distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica podem ocorrer como consequência do estresse em peixes, devido à relação entre os fluidos corpóreos nas brânquias e o ambiente externo (WENDELAAR BONGA, 1997). Isso pode levar a alterações nas concentrações plasmática de íons sódio, potássio e cloreto e a osmolaridade total, que são exemplos de efeitos subletais de poluentes em peixes (ABEL, 1989).

Os eritrócitos são células que estão em contato direto com os xenobióticos e podem sofrer alterações.

O teste do micronúcleo (MN) é um biomarcador importante que tem sido amplamente usado em estudos de genotoxicidade para estimar danos citogenéticos causados por agentes químicos ou físicos (CAVALCANTE, 2009). MNs resultam de fragmentos de cromossomos que não migraram para os pólos da célula durante a anáfase e podem ser formados por apoptose, inativação da formação do fuso ou dano no cromossomo, devido a um agente químico ou físico (AL-SABTI e METCALFE, 1995, HEDDLE et al., 1991).

Alterações nucleares podem refletir dano genotóxico ocorrido durante o tempo equivalente ao do ciclo celular (RAMSDORF et al., 2009) sendo que, na maioria das vezes, é necessária uma exposição mais longa (14 dias) para que se possa acumular a

substância tóxica no organismo até uma concentração capaz de causar tais alterações (BEDOR et al., 2009). MN são estruturas circulares de mesma refração que o núcleo, não ligadas a esse, e que possuem um tamanho que corresponda de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula. No caso dos peixes, devido ao tamanho normalmente reduzido dos cromossomos, a proporção de tamanho passa para a faixa de 1/10 a 1/30 do tamanho do núcleo. O uso de MN como marcador intermediário permite mensuração de forma acurada e objetiva da frequência de defeitos no DNA. Os MN aparecem após o dano, antes mesmo de qualquer alteração pré-maligna clínica ou mesmo histológica (CAVALCANTE, 2009).

Esse teste pode servir como um primeiro passo no estudo de qualquer substância mutagênica, por ser um teste rápido e sensível, tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais como numéricas. Uma vez que os teleósteos apresentam eritrócitos nucleados, a presença de micronúcleos pode ser usada como medida da atividade clastogênica (quebra de cromossomos) ou aneugênica (segregação cromossômica anormal) de uma substância em ambiente aquático. Em todos os ensaios com MN é importante que seja considerado a sua ocorrência espontânea (CAVALCANTE, 2009).

Em peixes, a formação de MN ocorre espontaneamente, porém em uma frequência menor do que em roedores, por exemplo. A frequência espontânea de MN varia dependendo do método usado e da manipulação dos peixes. Os mecanismos pelos quais poluentes induzem MN em peixes e a interação entre os efeitos e os poluentes ainda não são completamente conhecidos (CAVALCANTE, 2009).

Estudos têm demonstrado que a formação de MN pode ser reversível. Depois de cessada a exposição, tem-se observado que a contagem de células com MN reduz

rapidamente, sugerindo que, sem a ação do agente genotóxico, o processo de reparo do DNA se torna eficaz (CAVALCANTE, 2009).

1.3.4 Biomarcadores morfológicos

Alterações histopatológicas também têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores na avaliação da saúde de peixes frente à exposição a contaminantes, tanto em estudos em laboratórios como em estudos de campo (WESTER e CANTON, 1991; SCHWAIGER et al., 1997). Esses estudos ajudam a identificar órgãos alvo da toxicidade e os mecanismos de ação dos contaminantes. Os efeitos em níveis histopatológicos são visíveis como em outras medidas de toxicidade, tais como mortalidade e mudanças comportamentais (WESTER, 2002). Peixes são ótimos como sentinelas ambientais. Assim, efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em células e tecidos, antes que mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa possam ser identificadas (VAN DYK, 2005). As brânquias e fígado, são alguns dos órgãos alvo mais comumente utilizados para análises histopatológicas, pois podem ser diretamente afetados pelos xenobióticos presentes no meio.

Em peixes de água doce, os xenobióticos são, em geral, absorvidos principalmente pelas brânquias, devido ao grande volume de água que passa por elas para que ocorram as trocas gasosas, distribuídos no organismo, via circulação do sangue, e metabolizados no fígado que é o principal órgão de detoxificação do organismo (KÖHLER, et al., 1992; TEH et al., 1997; CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; MAZON et al., 2002; SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2010).

Alterações histopatológicas no fígado, como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusóides e

neoplomas podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, desta forma, considerados como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (KÖHLER, et al., 1992; TEH et al., 1997). As alterações histopatológicas mais severas observadas no fígado são mais frequentes em indivíduos de áreas contaminadas, mas que também ocorrem em indivíduos de áreas menos degradadas, só que em menor frequência (SCHWAIGER et al. 1997).

As alterações morfológicas nas brânquias podem representar estratégias adaptativas para a conservação de algumas funções biológicas quando o animal enfrenta mudanças ambientais.

1.4 O peixe neotropical *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)

O curimatá, *Prochilodus lineatus* é uma espécie representativa da região sudeste do Brasil devido a sua ampla distribuição nessa região, sendo também endêmico na bacia formada pelos rios Paraná e Paraguai cujo abastecimento provém do Aquífero Guarani, o maior reservatório de água subterrânea do Cone Sul. A espécie tem elevada tolerância a variações de temperatura (BARRINUEVO e FERNANDES, 1995) e de pH (TAKASUSUKI et al., 2004) apresentando um ótimo potencial para a piscicultura. Por ter hábito alimentar detritívoro, o custo de produção com esta espécie é baixo, tornando-se uma alternativa economicamente atrativa (ITUASSÚ et al. 2005). O curimatá é considerado um peixe de grande porte, podendo atingir até 6kg. Mesmo sendo uma espécie migradora para fins reprodutivos, estes não fazem desova natural em cativeiros, porém, não apresentam problemas com relação à produção de gametas, viabilizando a desova por indução hormonal (ITUASSÚ et al. 2005).

Portanto, devido à sua importância econômica, por ter sua biologia bem conhecida e ser sensível a poluentes, esta espécie é apropriada para testes de toxicidade (MARTINEZ e CÓLUS, 2002; CAMARGO e MARTINEZ, 2006). Estudos com *P. lineatus* têm sido realizados tanto em laboratório quanto “in situ”, para avaliação dos efeitos de contaminantes (MAZON e FERNANDES, 1999; MARTINEZ e SOUZA, 2002; WINKALER et al., 2007). A espécie tem potencial para ser considerada como bioindicadora em projetos de monitoramento ambiental por ter moderada a alta sensibilidade a diversos poluentes e hábito alimentar detritívoro tendo contato com contaminantes tanto na coluna d’água quanto no sedimento (MAZON et al., 2002; PAULINO et al., 2012; SIMONATO et al., 2008) e é importante em estudos ecotoxicológicos.



Figura 3. Exemplar de um jovem da espécie *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847).

1.5 Justificativa do estudo e hipótese

Devido à carência de trabalhos para se testar a toxicidade do diflubenzuron (Dimilin®), principalmente em peixes, o presente trabalho visa fornecer informações

sobre este inseticida. Através dos efeitos causados em *Prochilodus lineatus*, poderá se avaliar se a utilização deste produto em pisciculturas para o tratamento dos peixes é viável.

H0: a exposição crônica ao inseticida Dimilin® (composto ativo Diflubenzuron 25%) não causa alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas em *Prochilodus lineatus*.

H1: a exposição crônica ao inseticida Dimilin® (composto ativo Diflubenzuron 25%) causa alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas em *Prochilodus lineatus*.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial toxicológico e a ação do inseticida Dimilin® (princípio ativo diflubenzuron – DFB) em *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1847). E, dessa forma, gerar indicadores sensíveis para o monitoramento dos recursos hídricos de áreas rurais associadas à produção agrícola em que o inseticida é utilizado e testar sua toxicidade para a espécie em questão, mostrando se sua utilização em pisciculturas é adequada ou não no tratamento dos peixes.

1.6.2 Objetivos específicos

Identificar os efeitos da exposição ao DFB em curimatá, *Prochilodus lineatus* utilizando biomarcadores em diferentes níveis de organização biológica: genotóxico, bioquímico, e histológico:

- Avaliar a frequência de micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocíticas nos eritrócitos de *P. lineatus* após exposição ao DFB;
- Analisar a concentração dos íons plasmáticos e osmolaridade total do plasma e determinar a atividade das enzimas Na^+/K^+ - ATPase e H^+ - ATPase branquial de *P. lineatus* após exposição ao DFB;
- Determinar a concentração de peróxidos de lipídios nas brânquias e fígado de *P. lineatus* após exposição ao DFB;
- Avaliar as alterações histopatológicas nas brânquias e fígado de *P. lineatus* após exposição ao DFB.

2 Materiais e métodos

Exemplares de *Prochilodus lineatus* (massa corpórea: $21,8 \pm 1,0$ g; comprimento total: $13,5 \pm 0,2$ cm) provenientes da Estação de Piscicultura do Reservatório da Usina Hidrelétrica de Furnas, São José da Barra, MG, foram transportados para o laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, aclimatados em laboratório (10 dias) em tanques de 1000L com aeração contínua, com fotoperíodo natural (12 horas claro, 12 horas escuro). Os animais foram alimentados *ad libitum*, uma vez ao dia, com ração comercial (40% proteína, FRI-ACQUA 40, Fri-Ribe Rações, SP, Brazil).

Tabela 2. Comprimento total e padrão dos peixes. Os dados são apresentados como média±erro padrão da média.

Comprimento Total				
Controle	0,25	0,5	1,0	2,0
14.05±0.4311	13.12±0.2611	13.88±0.295	13.75±0.4488	12.71±0.3595

Comprimento Padrão				
Controle	0,25	0,5	1,0	2,0
11.1±0.2873	10.63±0.2758	11.31±0.3265	10.85±0.3337	9.929±0.2766

As mensurações das variáveis concentração de oxigênio dissolvido ($7,6\pm 0,03$ mg/L), pH ($6,6\pm 0,02$), temperatura ($23,8\pm 0,7^{\circ}\text{C}$), condutividade elétrica ($77,3\pm 0,7$ $\mu\text{S/cm}$) e total de sólidos dissolvidos ($0,05\pm 0,0004$ %), foram efetuadas a cada 24h, com o auxílio de uma sonda multiparâmetro (YSI 6820 V2) para avaliação da qualidade de água.

Tabela 3. Mensurações das variáveis da água: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), condutividade ($\mu\text{S/cm}$), total de sólidos dissolvidos (TDS %), oxigênio dissolvido (OD mg/L) e pH. Os dados são apresentados como média±erro padrão da média.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Condutividade ($\mu\text{S/cm}$)	TDS (%)	OD (mg/L)	pH
23.82±0.65	77.34±0.71	0.05±0.0004	7.64±0.03	6.6±0.02

2.1 Desenho experimental

Os exemplares de *P. lineatus* foram expostos as seguintes concentrações subletais de Dimilin® 25W (CHEMTURA – DIFLUBENZURON 25%): 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, concentrações utilizadas para controle de larvas de insetos em pisciculturas (FUJIMOTO et al., 1999, SCHALCH et al., 2005, LUVIZOTTO-

SANTOS et al. 2009), durante 14 dias (336 horas) e em sistema semi-estático, com renovação de 80% da água com a solução teste, a cada 24 horas. Cada experimento foi realizado em duplicata, com 6 peixes em cada aquário (200L) sendo 12 peixes por tratamento (N=12). Dois aquários foram mantidos como grupo controle (00 mg L⁻¹ Dimilin® 25W), com as mesmas condições dos demais, porém sem a presença do Dimilin®. Durante os experimentos as características físicas e químicas da água foram similares às do período de aclimação.

Ao final da exposição uma amostra de sangue foi retirada via punção da veia caudal (~2ml) para confecção de extensões sanguíneas para determinação da frequência de ANE e MN e posterior análise dos íons e osmolaridade do plasma. Posteriormente, os peixes foram sacrificados por secção da medula. As brânquias e fígados foram removidos e amostras foram congeladas a -80°C para posterior análise da peroxidação lipídica, Na⁺/K⁺ - ATPase e H⁺ - ATPase ou fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 para as análises histopatológicas.

2.2 Análise comportamental dos peixes expostos ao inseticida Dimilin®

O comportamento dos exemplares de *P. lineatus* foi avaliado através de observação durante os 14 dias de exposição ao inseticida Dimilin®. Características como a quantidade de muco na água, alterações dos padrões natatórios dos animais e quantidade de ração acumulada no aquário foram observadas em cada grupo expostos as diferentes concentrações do inseticida (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e comparadas com o grupo controle (00 mg L⁻¹).

2.3 Análises genéticas, bioquímicas e morfológicas

2.3.1 Micronúcleo e anormalidades nucleares eritrocíticas

Para a determinação da frequência de ANE e MN, 24h após a confecção das lâminas, as extensões sanguíneas foram fixadas em metanol por 10 minutos, e posteriormente coradas, segundo a metodologia de Tavares-Dias e Moraes (2003) com a solução May Grünwald-Giemsa-Wright (*MGGW*) por 1 minuto. Duas mil células de cada animal foram contadas e o número de MN e ANE anotados. As ANE foram classificadas, segundo descrito por Hoftman e Raat (1982), em núcleo segmentado, lobulado, em forma de rim e foram considerados MNs as estruturas morfológicamente semelhantes ao núcleo principal com diâmetro entre 1/16 a 1/3 do núcleo principal; não apresentavam refringência; não estavam ligadas ou conectadas ao núcleo principal.

2.3.2 Peroxidação lipídica

As amostras de fígado e brânquias foram homogeneizadas em tampão fosfato, o sobrenadante foi retirado para quantificação da LPO. O nível de lipoperoxidação tecidual das brânquias e fígado foi determinado pela oxidação do Fe^{2+} na presença de xilenol laranja, em 560 nm, utilizando-se o ensaio FOX de acordo com a metodologia de Jiang et al. (1992). Para isso a cada fração sobrenadante obtida foi adicionada a solução de reação: metanol (grau HPLC) 90% (90% do volume final), ácido sulfúrico (H_2SO_4), hidroxitolueno butilado (BHT) e sulfato ferroso amoniacal (ASF) e xilenol laranja para a reação de cor. A análise foi realizada em espectrofotômetro e comparada às amostras brancas contendo apenas metanol, os resultados foram expressos em μmol

CHP.mgPt⁻¹. A concentração total de proteína foi mensurada segundo a metodologia de Bradford (1976).

2.3.3 Histopatologias das brânquias e fígado

Amostras de brânquias e fígado fixadas foram desidratadas, incluídas em historesina e seccionadas com 3 µm de espessura. As secções de brânquias foram coradas com azul de toluidina e as de fígado foram coradas com azul de toluidina e fucsina básica, as imagens digitais das secções foram obtidas utilizando microscópio de luz (OLYMPUS, DENMARK), objetiva 40x, câmera acoplada a um computador e software Motic Image Plus 2.0 software (HONG KONG, CHINA).

A frequência de lesões nas brânquias foi quantificada em um total de 14 tipos de histopatologias encontradas e no fígado 25 tipos de histopatologias. Essas lesões foram classificadas em três níveis: nível 1, ausência de alterações histopatológicas (brânquias de 0 a 4 e fígado de 0 a 8 histopatologias); nível 2, ocorrência de lesões pontualmente localizadas (brânquias de 5 a 9 e fígado de 9 a 17 histopatologias) e nível 3, lesões amplamente distribuídas pelo órgão (brânquias de 9 a 14 e fígado de 17 a 25 histopatologias) de acordo com Schwaiger et al. (1997) para o cálculo do valor médio de alterações (VMA) que indica a distribuição de lesões no órgão.

O tipo e a severidade das lesões nas brânquias foram analisadas de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) adaptada por Cerqueira et al. (2002) e Meletti et al. (2003) para o cálculo do índice de alterações histopatológicas (IAH). Quatro filamentos branquiais foram analisados em cada corte histológico (4 cortes) de cada amostra. As lesões foram classificadas em 4 grupos de acordo com o tipo e a localização da lesão: G1, hipertofia e hiperplasia do epitélio branquial e alterações relacionadas; G2,

alterações nas células mucosas e/ou cloreto; G3, alterações nos vasos sanguíneos; e G4, fibrose e necrose. As lesões foram classificadas em 3 estágios: estágio I, lesões não muito severas e que não afetam o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais (peso 0); estágio II, lesões moderadamente severas e que podem afetar o funcionamento do órgão (peso 1), podem ser irreversíveis, porém, no geral são pontuais; e estágio III, lesões muito severas e normalmente irreversíveis onde o funcionamento do órgão fica muito prejudicado (peso 2) (Tabela 4). A mesma classificação, utilizada por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e adaptada por Rigolin-Sá (1998), foi adotada para a análise do fígado (Tabela 5).

Tabela 4. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função branquial.

Estágios		
I	II	III
Hipertrofia do epitélio lamelar	Fusão total das lamelas	Necrose
Hiperplasia do epitélio lamelar	Aneurisma lamelar	
Congestão vascular	Ruptura epitelial	
Dilatação do canal marginal		
Descolamento epitelial		
Constricção do sistema de células pilares		
Proliferação de células-cloreto		
Proliferação de células mucosas		
Fusão parcial das lamelas		
Edema		

Tabela 5. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função hepática.

Estágios		
I	II	III
Edema intercelular	Hiperplasia	Necrose focal
Hipertrofia nuclear	Infiltração	Necrose total
Hipertrofia celular	Vacuolização nuclear	
Atrofia celular	Degeneração nuclear	
Atrofia nuclear	Degeneração citoplasmática	
Aumento da frequência de vasos	Núcleos picnóticos	
Deformação do contorno celular	Rompimento celular	
Deformação do contorno nuclear	Estagnação biliar	
Núcleos na periferia da célula	Ruptura de vasos	
Desarranjo dos cordões hepáticos	Congestão	
Melanomacrófagos		
Vacuolização citoplasmática		
Grânulos eosinófilos		

O IAH corresponde ao resultado da somatória das lesões em cada grupo elevada ao valor dos pesos dos diferentes estágios ($IAH = 10^{\circ}\Sigma I + 10^I \Sigma II + 10^2 \Sigma III$). Os valores de IAH foram classificados em 4 categorias: 0 a 10 indicam um funcionamento normal do órgão; 11 a 20 indicam danos de leves a moderados no órgão; 21 a 50 indicam danos de moderados a severos e, acima de 100 que indicam danos irreparáveis no órgão. O tipo e a severidade das lesões no fígado para o cálculo do IAH foram analisados de acordo com Camargo e Martinez (2008). No fígado foram analisados 20 campos aleatórios em cada secção de tecido hepático, em um total de 4 cortes (5 campos por corte), e também calculado o VMA.

2.3.4 Análise dos íons plasmáticos e osmolaridade

O sangue coletado foi centrifugado e o plasma separado para análise dos íons plasmáticos Na^+ , K^+ , Cl^- e osmolalidade total. Na^+ , K^+ foram determinados utilizando

espectrofotômetro de chama (DIGIMED, DM-61). Para o íon Cl^- utilizado kit comercial (LABTEST, BRASIL) com absorbância em 490 nm em leitora de microplaca (MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, USA), a osmolalidade foi determinada utilizando um semi-microsmômetro (OSMETTE PRECISION SYSTEM) com base no ponto de congelamento da amostra.

2.3.5 Atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e H^+ -ATPase branquial

Após lavagem em solução salina, alguns filamentos branquiais foram separados dos arcos e congelados (-80°C) em tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4). Os filamentos branquiais foram homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a $10.000g$ (4°C).

A atividade das enzimas nas brânquias dos peixes foi determinada por meio do micro-ensaio enzimático descrito por Gibbs e Somer (1989) modificado por Kultz e Somero (1995) e por Gonzalez e colaboradores (2005). Os ensaios são baseados na defosforilação do ATP para a oxidação do NADH, sendo a atividade da NKA determinada na fração sensível a ouabaína, enquanto a fração sensível ao NEM (inibidor da H^+ -ATPase) foi utilizada para avaliar a atividade da H^+ -ATPase. Em cada um dos ensaios foi determinada a concentração de proteínas totais das amostras de brânquia, segundo método descrito por Bradford et al. (1976), sendo a atividade final das enzimas NKA e H^+ -ATPase descritas em μmol de ATP por mg de proteína $^{-1}$ por h^{-1} (ATP $\text{mgPT}^{-1} \text{h}^{-1}$).

2.3.6 Atividade da enzima anidrase carbônica

A determinação da enzima anidrase carbônica (AC) foi desenvolvida segundo protocolo de Henry (1991) adaptado por Vitale et al. (1999), onde o CO₂ foi catalizado pela presença da enzima AC com correspondente liberação de H⁺ e consequente decaimento do pH vs. tempo. Amostras de brânquias foram homogeneizadas em tampão imidazol (imidazol 10 mM, pH 7,5-7,6) e em seguida 50 µL do homogenado foi adicionado a uma solução de reação (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 10 mM tris base e 10 mM NaH₂PO₄, pH 7,4) e água saturada com CO₂. As leituras foram realizadas a cada 4 segundos, durante 20 segundos com um pHmetro (QUIMIS Q-400A).

2.4 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média. Aos dados de cada análise foi aplicado primeiramente o Teste de Normalidade de D'Agostino e Pearson. Após isso, para os dados que passaram no teste de normalidade (peroxidação lipídica do fígado, ANE e MN) foi aplicado a Análise de Variância (ANOVA), seguido do Teste de Multipla Comparação de Bonferroni. Para os demais dados que não passaram no teste de normalidade e para os dados de frequência foi aplicado o Teste Não-Paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Multipla Comparação de Dunn. A diferença significativa entre os grupos foi considerada quando $P \leq 0,05$. A estatística foi realizada segundo Zar (BIostatistical Analysis, 2009).

3 Resultados

3.1 Análise comportamental dos peixes expostos ao inseticida Dimilin®

Durante a exposição dos exemplares da espécie *Prochilodus lineatus* durante 14 dias ao inseticida Dimilin®, observou-se alterações no comportamento dos animais expostos as concentrações mais altas do produto na água. Nos grupos de concentração 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ de Dimilin® não foram observadas alterações bem evidentes em relação ao grupo controle (00 mg L⁻¹ de Dimilin®), no entanto, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de Dimilin®, pode-se observar alterações nos padrões natatórios dos animais, acúmulo de muco na água e excesso de ração, indicando que esses animais não estavam se alimentando bem, essas alterações foram bem visíveis principalmente na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de Dimilin®.

3.2 Micronúcleo e anormalidades Nucleares eritrócíticas (ANE)

As seguintes anormalidades foram encontradas nos eritrócitos: núcleo segmentado, núcleo lobulado, núcleo em formato de rim e micronúcleo (Figura 4).

O núcleo em formato de rim foi a ANE mais frequente nos eritrócitos de *P. lineatus* expostos ao Dimilin®, seguida de micronúcleo, núcleo lobulado e núcleo segmentado (Tabela 6). As maiores frequências de ANE ocorreram nos animais expostos a 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de Dimilin®. A porcentagem das ANE nos grupos expostos a concentração 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (00 mg L⁻¹) (Figura 5).

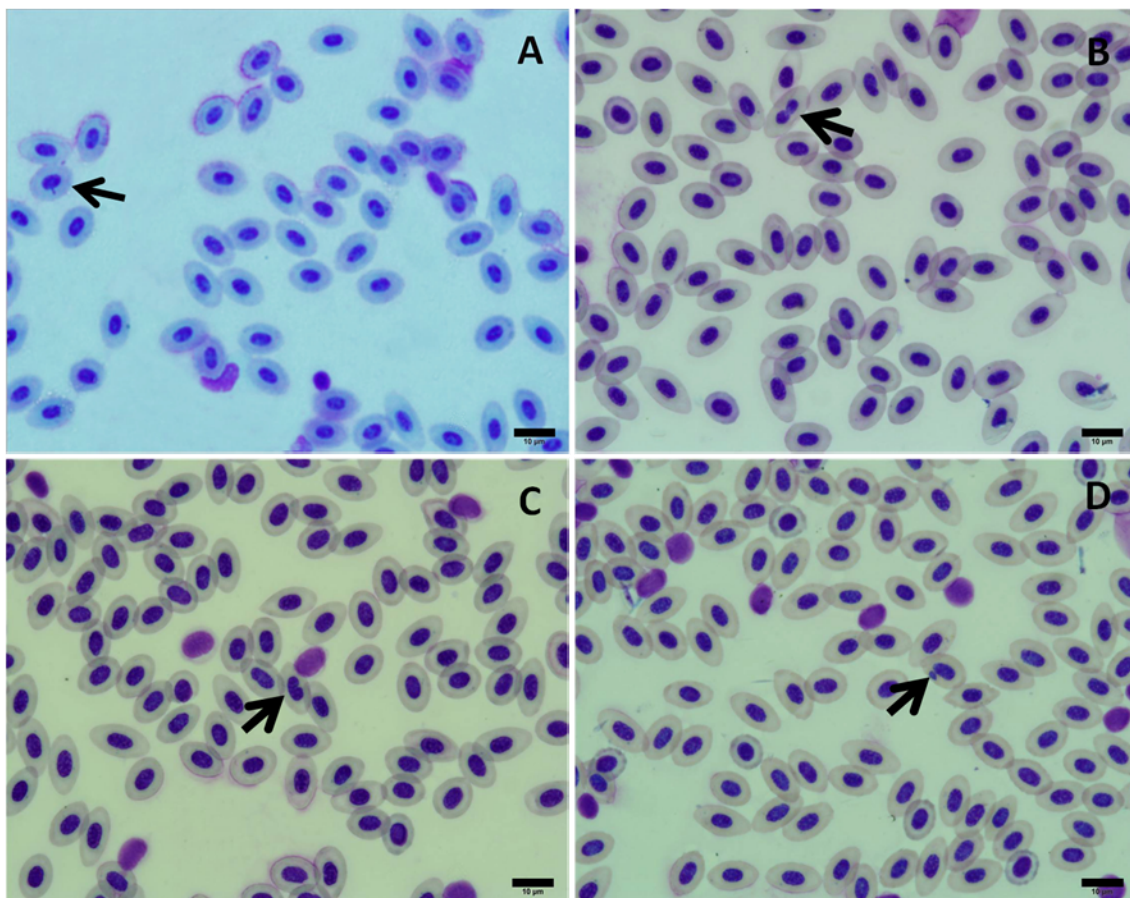


Figura 4. Anormalidades nucleares e micronúcleos no sangue de *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. Em A: núcleo segmentado; em B: núcleo lobulado; em C: núcleo em formato de rim e em D: micronúcleos. Escala 10µm. Solução May Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW).

Tabela 6. Frequência das alterações nucleares eritrocíticas - ANE (núcleo segmentado, núcleo lobulado, núcleo em formato de rim e micronúcleos) em *P. lineatus* expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. Os dados são apresentados como média±erro padrão da média. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L⁻¹).

ANE	Concentrações de Dimilin®				
	0,0 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹	0,5 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹	2,0 mg L ⁻¹
<i>Formato de Rim</i>	0.02±0.008	0.06±0.019	0.2±0.067*	0.18±0.029*	0.286±0.023*
<i>Lobado</i>	0.01±0.007	0.025±0.011	0.044±0.020	0.02±0.011	0.114±0.018*
<i>Segmentado</i>	0±0	0.015±0.008	0.056±0.015*	0.05±0.017*	0.007±0.005
<i>Micronúcleo</i>	0.015±0.011	0.02±0.011	0.025±0.013	0.18±0.046*	0.157±0.022*

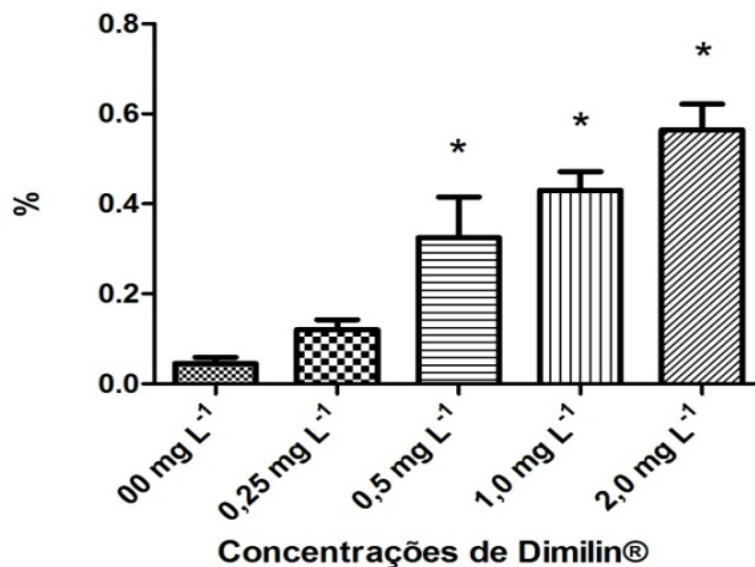


Figura 5. Frequência das alterações nucleares eritrocíticas – ANE (núcleo segmentado, núcleo lobulado, núcleo em formato de rim e micronúcleos) em *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle (00 mg L⁻¹).

3.3 Lipoperoxidação das brânquias e fígado

A concentração de peróxido de lipídeos nas brânquias diminuiu significativamente no grupo exposto a 2,0 mg L⁻¹ Dimilin® em relação ao grupo controle (00 mg L⁻¹) (Figura 6A) enquanto que no fígado ocorreu um aumento significativo nos grupos expostos a 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ Dimilin® em relação ao grupo controle (Figura 6B).

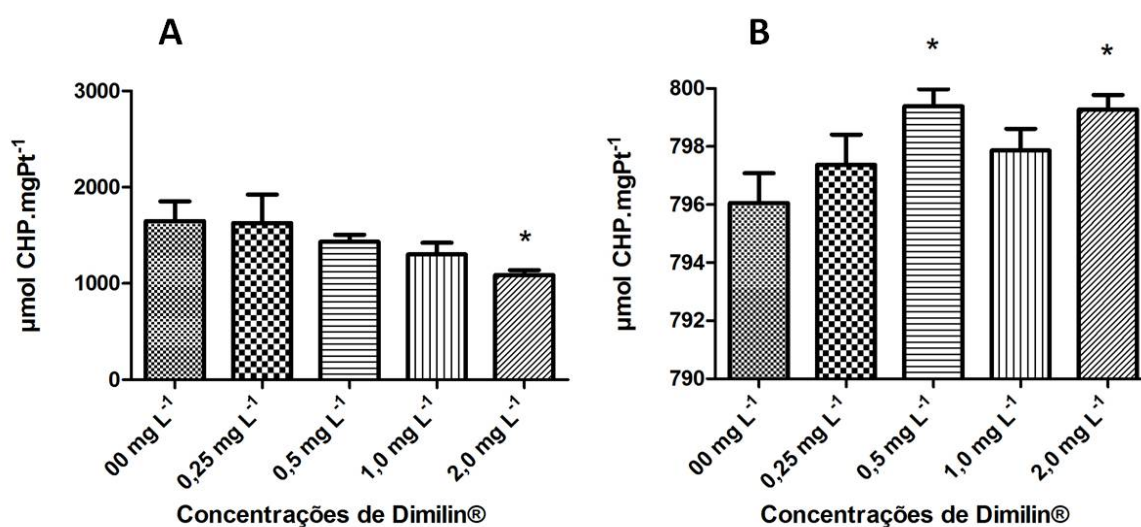


Figura 6. Lipoperoxidação das brânquias (A) e fígado (B), em *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle (0 mg L⁻¹).

3.4 Histopatologia das brânquias de *P. lineatus*

Várias alterações foram observadas nas brânquias dos peixes expostos ao DFB, porém, as mais frequentes foram as classificadas como estágio I, tais como: hipertrofia e hiperplasia do epitélio do filamento, dilatação do canal marginal, descolamento epitelial e proliferação de células cloreto (Figura 7 e Tabela 6).

O VMA não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. O IAH foi significativamente maior nos grupos expostos a 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ em relação ao grupo controle (00 mg L⁻¹), porém em todos os grupos expostos ao Dimilin®, os valores de IAH ultrapassaram o índice 10, evidenciando que as brânquias apresentavam alterações leves a moderadas (Figura 8).

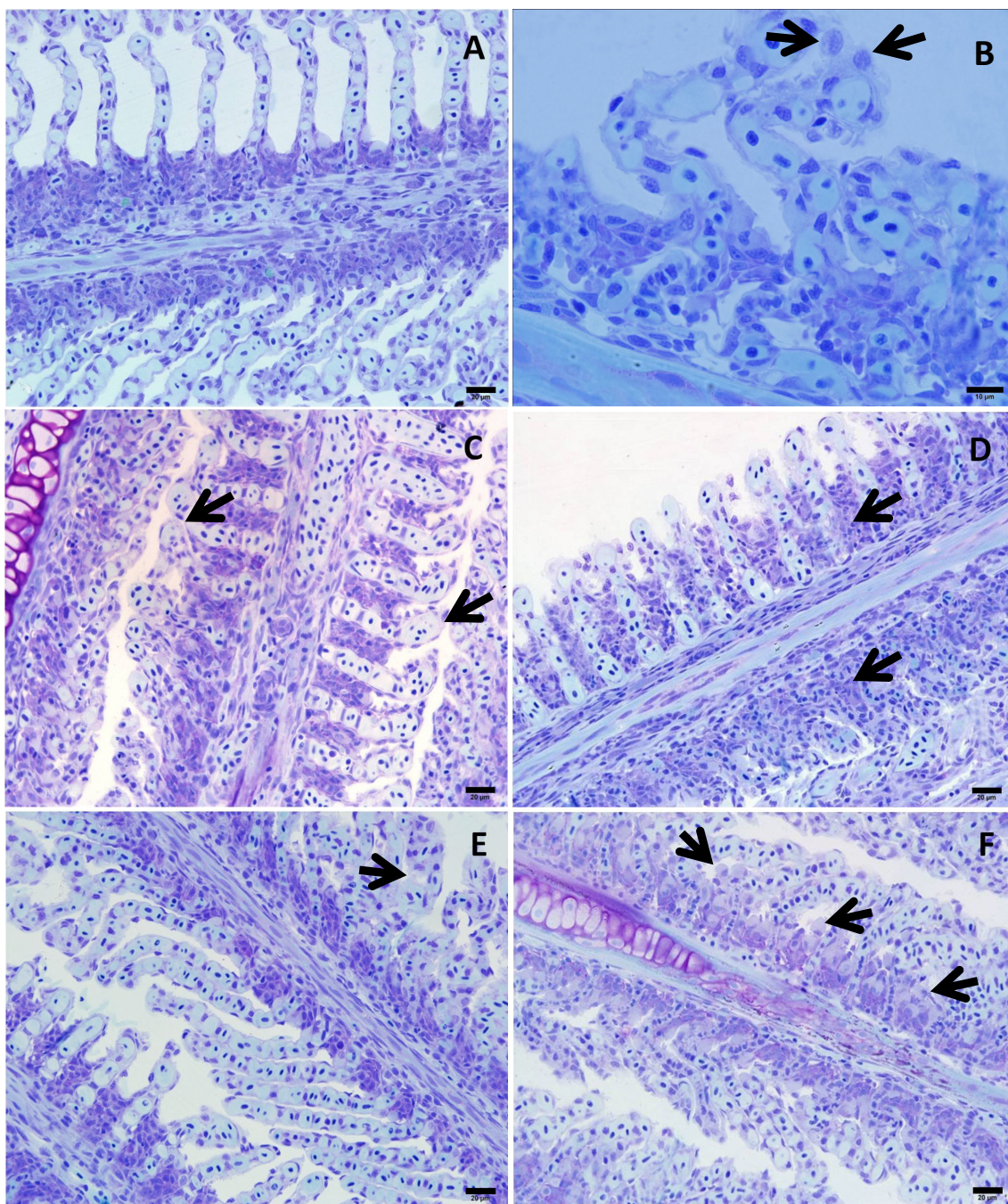


Figura 7. Alterações histopatológicas mais frequentes nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. Em A: tecido relativamente sem alterações; B: Hipertrofia do epitélio lamelar; C: dilatação do canal marginal; D: hiperplasia do epitélio do filamento; E: descolamento epitelial; F: proliferação de células cloreto. Figuras A, C, D, E e F 20 µm, figura B 10 µm. Azul de Toluidina.

Tabela 7. Avaliação qualitativa da frequência das alterações histopatológicas nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimlin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. Em 0 = ausente; 0+ = raramente frequente; + = frequente; ++ = muito frequente; +++ = extremamente frequente.

Alteração	Estágio	00 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹	0,5 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹	2,0 mg L ⁻¹
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	++	+++	+++	+++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	+	++	++	+++	+++
Congestão vascular	I	0+	++	++	+++	++
Dilatação capilar	I	++	+++	++	+++	+++
Descolamento epitelial	I	0+	+	++	+++	+++
Constrição capilar	I	0	+	++	+	+
Proliferação de células cloreto	I	0+	+	++	+++	+++
Proliferação de células mucosas	I	0+	0	0	0	0
Fusão das lamelas	I	0+	0+	+	+	+
Edema	I	0	0+	+	0+	+
Aneurisma lamelar	II	0	0	0	0+	0+
Ruptura epitelial (hemorragia)	II	0	0+	0+	+	++
Necrose focal	III	0	0	0	0	0
Necrose total	III	0	0	0	0	0

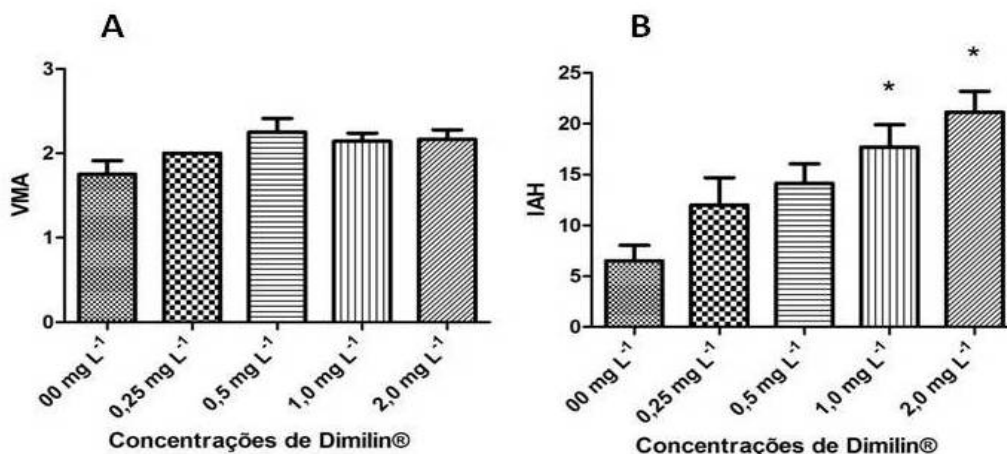


Figura 8. Brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. A. valor médio de alteração (VMA); B. Índice de alteração histopatológica (IAH). (*) indica diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao controle (00 mg L⁻¹).

3.5 Histopatologia do fígado de *P. lineatus*

A exposição dos peixes ao Dimilin® provocou várias alterações morfológicas no fígado. As alterações mais frequentes foram as de estágio I e II: desarranjo dos cordões hepáticos, grânulos eosinófilos, vacuolização nuclear e degeneração nuclear (Figura 9 e Tabela 8). Outras alterações também foram encontradas: edema intercelular, hipertrofia nuclear, hipertrofia celular, atrofia celular, atrofia nuclear, aumento da frequência de vasos, deformação do contorno celular, deformação do contorno nuclear, núcleos na periferia da célula, melanomacrófagos, vacuolização citoplasmática, hiperplasia, infiltração, degeneração citoplasmática, núcleos picnóticos, rompimento celular, ruptura de vasos, congestão e raramente necrose focal.

O VMA (Figura 10A) calculado para os grupos expostos a 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ do fígado de *P. lineatus* aumentou significativamente em relação ao grupo controle (00 mg L⁻¹). O IAH (Figura 10B) também aumentou significativamente nos mesmos grupos em relação ao controle, porém nenhum dos grupos apresentou valor de IAH maior que 100.

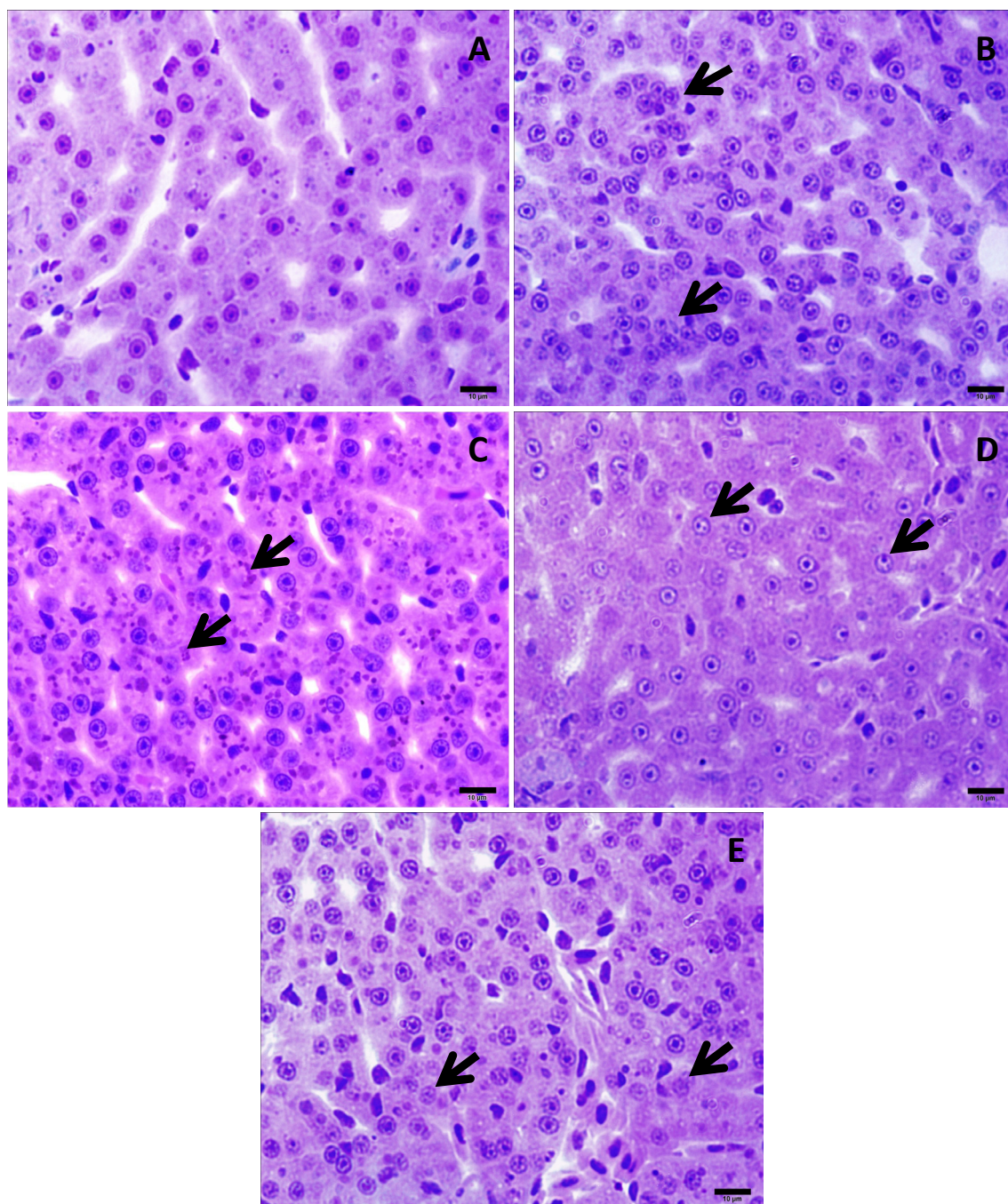


Figura 9. Alterações histopatológicas mais frequentes no fígado de *Prochilodus lineatus* expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. Em A: tecido relativamente sem alterações; B: desarranjo dos cordões hepáticos; C: grânulos eosinófilos; D: vacuolização nuclear; E: degeneração nuclear. Escala 10 µm. Azul de toluidina e fucsina básica.

Tabela 8. Avaliação qualitativa da frequência das alterações histopatológicas no fígado de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. Em 0 = ausente; 0+ = raramente frequente; + = frequente; ++ = muito frequente; +++ = extremamente frequente.

Alterações	Estágio	00 mg L ⁻¹	0,25 mg L ⁻¹	0,5 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹	2,0 mg L ⁻¹
Edema intercelular	I	0+	0+	+	++	++
Hipertrofia nuclear	I	0+	0+	0+	0+	0+
Hipertrofia celular	I	0+	0+	0+	0+	0+
Atrofia celular	I	0+	0+	0+	+	+
Atrofia nuclear	I	0+	0+	0+	+	+
Aumento da frequência de vasos	I	0+	0+	0+	0+	0+
Deformação do contorno celular	I	0+	+	+	++	+++
Deformação do contorno nuclear	I	+	+	+	+	+
Núcleos na periferia da célula	I	0+	0+	0+	+	+
Desarranjo dos cordões hepáticos	I	0+	++	+++	++	+++
Melanomacrófagos	I	0+	0+	0+	0+	0+
Vacuolização citoplasmática	I	0+	0+	+	+	+
Grânulos eosinófilos	I	++	+++	++	++	+++
Hiperplasia	II	0+	0+	0+	+	+
Infiltração	II	+	+	++	++	++
Vacuolização nuclear	II	+	+	++	+++	+++
Degeneração nuclear	II	+	+	++	+++	+++
Degeneração citoplasmática	II	0+	0+	0+	+	+
Núcleos picnóticos	II	0+	0+	0+	0+	0+
Rompimento celular	II	0+	0+	0+	0+	0+
Estagnação biliar	II	0	0	0	0	0
Ruptura de vasos	II	0+	0+	0+	0+	0+
Congestão	II	0+	0+	+	+	++
Necrose focal	III	0	0+	0	0	0
Necrose total	III	0	0	0	0	0

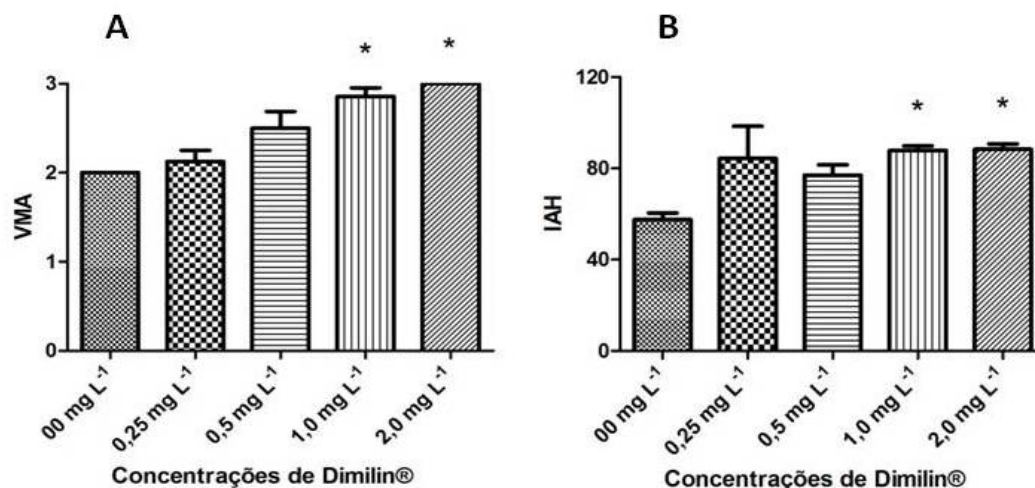


Figura 10. Fígado de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. Em A: valor médio de alteração histopatológica (VMA). Em B: índice de alteração histopatológica (IAH). (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L⁻¹).

3.6 Análise dos íons plasmáticos e osmolaridade

A osmolaridade total do plasma aumentou de forma significativa no grupo exposto a 0,5 mg L⁻¹ de Dimilin® em relação ao grupo controle (00 mg L⁻¹) (Figura 11).

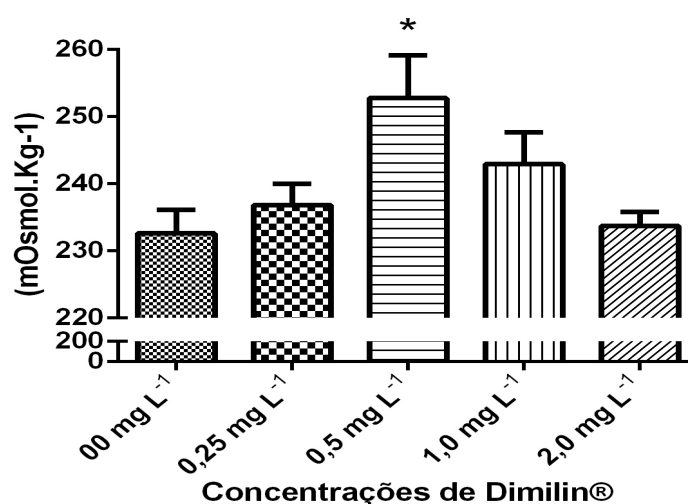


Figura 11. Osmolaridade total do plasma de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L⁻¹).

Já na análise do íon Na^+ , não houve diferença significativa entre os grupos de exposição ao Dimilin® (Figura 12).

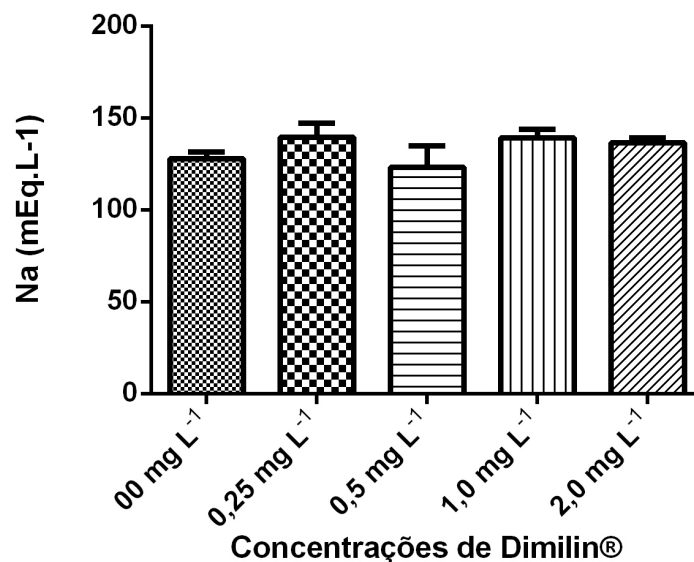


Figura 12. Concentração do íon Na^+ no plasma de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias.

O mesmo ocorreu com o íon K^+ no plasma de *Prochilodus lineatus*, não apresentando diferença significativa entre os grupos expostos ao Dimilin® (Figura 13).

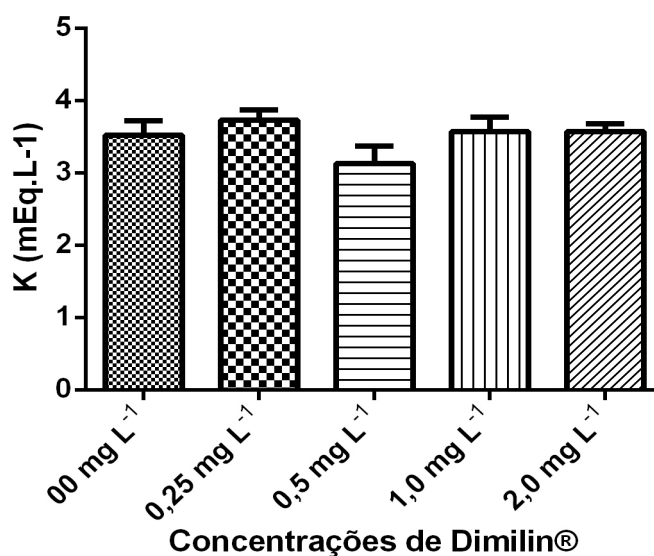


Figura 13. Concentração do íon K^+ no plasma de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias.

Em relação ao íon Cl^- , houve uma diminuição significativa de sua concentração no plasma de *Prochilodus lineatus* no grupo exposto a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ do inseticida Dimilin® em relação ao grupo controle (00 mg L^{-1}) (Figura 14).

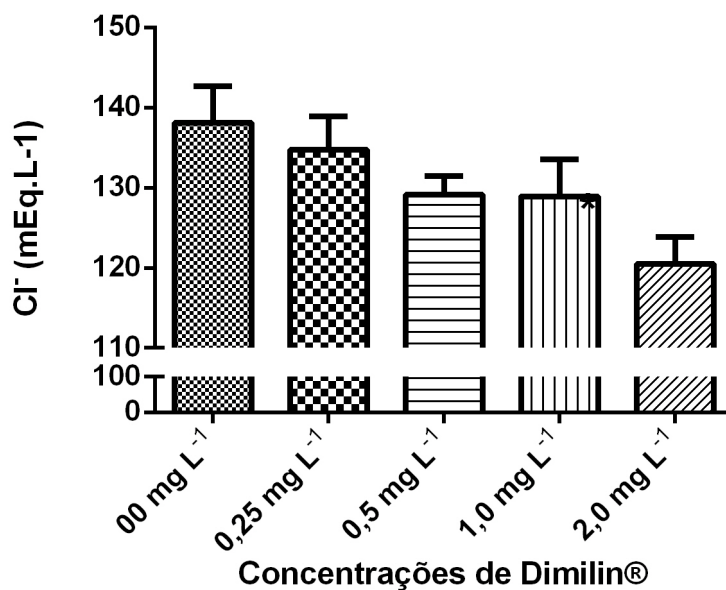


Figura 14. Concentração do íon Cl^- no plasma de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® ($00, 0,25, 0,5, 1,0$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L^{-1}).

3.7 Atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e H^+ -ATPase branquial

A atividade da NKA branquial não mostrou diferença significativa entre os grupos expostos a concentrações do inseticida Dimilin® (Figura15).

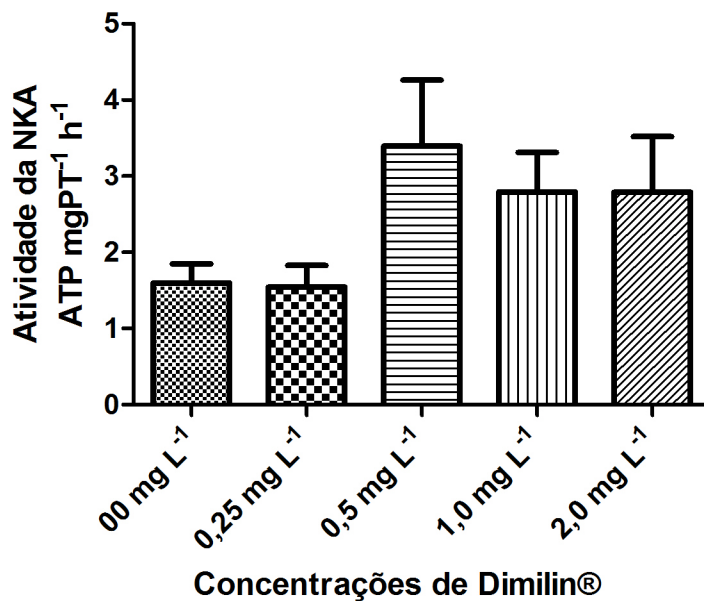


Figura 15. Atividade da enzima Na^+/K^+ - ATPase nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L^{-1}) durante 14 dias.

Já a atividade da H^+ - ATPase demonstrou um aumento significativo no grupo exposto a concentração de 1,0 mg L^{-1} do inseticida Dimilin® em relação ao grupo controle (00 mg L^{-1}) (Figura 16).

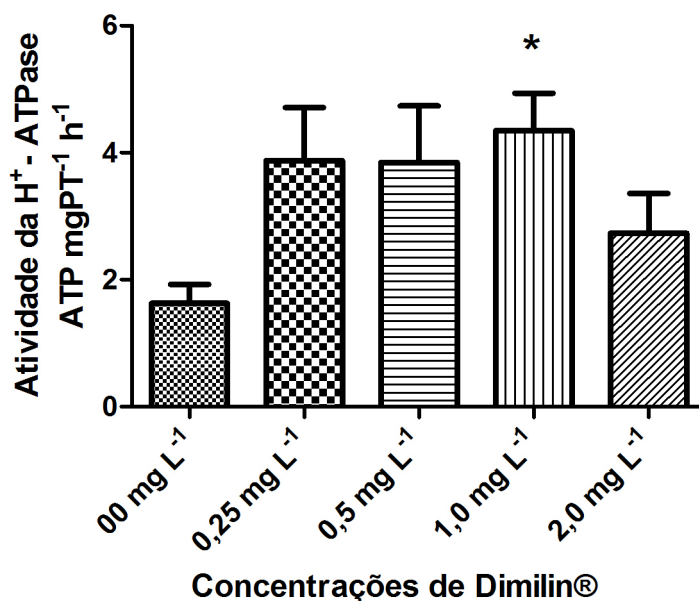


Figura 16. Atividade da H^+ - ATPase nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L^{-1}) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L^{-1}).

3.8 Atividade da enzima anidrase carbônica

A atividade da enzima anidrase carbônica demonstrou uma diminuição significativa no grupo exposto a 2,0 mg L⁻¹ do inseticida Dimilin® em relação ao grupo controle (00 mg L⁻¹) (Figura 17).

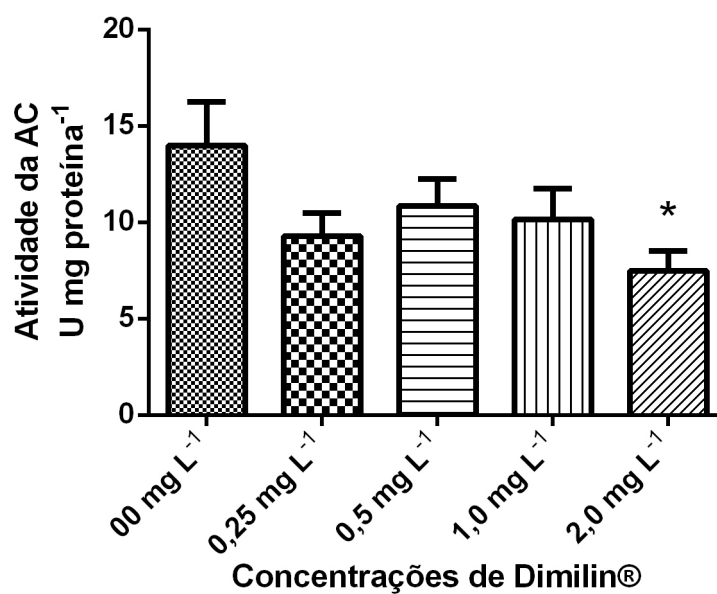


Figura 17. Atividade da anidrase carbônica nas brânquias de *Prochilodus lineatus*, expostos a concentrações subletais de Dimilin® (00, 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) durante 14 dias. (*) Indica diferença significativa em relação ao controle (00 mg L⁻¹).

4 Discussão

A exposição crônica a concentrações subletais de Dimilin® evidenciou que esse produto causa inúmeras alterações morfológicas nas brânquias, sangue e fígado, sendo esse efeito dose dependente, uma vez que foi observado um efeito dose-resposta que se elevou com o aumento da concentração do produto na água.

Todas as espécies de peixes têm uma taxa basal de formação de células anormais (SERIANE et al., 2011). Em *P. lineatus*, a frequência dessas anormalidades foi muito baixa no grupo controle, mas aumentou significativamente em peixes expostos a 1 e 2 mg L⁻¹ de DFB, sugerindo que o DFB apresenta potencial genotóxico em concentrações mais altas nos grupos expostos esse produto durante 14 dias. Ferraro et al. (2009) já demonstrou o potencial genotóxico de outros pesticidas após exposição crônica em estudos com *Rhamdia quelem* e *Astyanax bimaculatus* expostas ao Roundup® durante 15 dias, apresentaram frequência de Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) mais alta que o grupo controle, enquanto que não houve diferença significativa nos animais que foram submetidos a exposição aguda. Alterações nucleares podem refletir dano genotóxico ocorrido durante o tempo equivalente ao do ciclo celular (RAMSDORF et al., 2009) sendo que, na maioria das vezes, é necessária uma exposição mais longa para que se possa acumular a substância tóxica no organismo até uma concentração capaz de causar alterações (BEDOR et al., 2009).

Em mamíferos e aves, o DFB é metabolizado através da hidroxilação, conjugação e clivagem dos grupos ureia (OPDYCKE et al., 1982) formando a 4-cloroanilina que é considerada como o único metabólito ou produto de degradação do DFB que merece cautela, pois demonstrou ser mutagênica em ratos (PRASAD, 1970). Em *P. lineatus* expostos a DFB, o aumento de MN mostra o possível efeito

mutagênico dessa substância. MNs resultam de fragmentos de cromossomos que não migraram para os pólos da célula durante a anáfase e podem ser formados por apoptose, inativação da formação do fuso ou dano no cromossomo, devido a um agente químico ou físico (AL-SABTI e METCALFE, 1995; HEDDLE et al., 1991).

A degradação do DFB pode gerar ERO que são neutralizados pelo sistema antioxidante celular. Pereira-Maduenho e Martinez (2008) mostraram que durante a exposição aguda ao Dimilin®, há ativação do sistema de biotransformação, via aumento da atividade da glutathiona-S-transferase, e do sistema antioxidante com aumento da atividade da catalase. Entretanto o excesso da produção de ERO pode resultar em estresse oxidativo e ocorrer o aumento do LPO. O dano lipídico pode resultar também em transtornos na permeabilidade, alteração do fluxo iônico, alteração da seletividade de nutrientes e posteriormente, levando ao rompimento da membrana (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). No presente estudo, o aumento de LPO no fígado indicou que neste órgão ocorreu estresse oxidativo, enquanto que nas brânquias houve até uma diminuição da concentração de LPO. Embora, as brânquias sejam os primeiros órgãos em contato com os xenobióticos e o principal local em que são absorvidos pelo animal, esses órgãos parecem ter menor sensibilidade a alguns xenobióticos, provavelmente devido à rápida transferência do mesmo para o sangue (PAULINO et al., 2012; SHIOGIRI et al., 2012). Entretanto, sendo o fígado, o principal órgão de detoxificação do organismo, é onde ocorre maior acúmulo de substâncias tóxicas cujo processo de detoxificação pode gerar maior concentração de ERO e sobrepôr a capacidade de defesas antioxidantes do órgão resultando em aumento de LPO (HEATH, 1995).

Em geral, as brânquias respondem a 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; FERNANDES et al., 2007; CRESTANI et al., 2007; PAULINO et al., 2012; SHIOGIRI et al., 2012). As alterações histopatológicas como hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar, descolamento epitelial, fusão parcial de algumas lamelas e proliferação de células mucosa são exemplos de respostas de defesa, pois aumentam a distância entre o meio externo e o sangue, agindo como barreira para a entrada de contaminantes na corrente sanguínea (HINTON e LAURÉN, 1990; POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994; FERNANDES e MAZON, 2003; PAULINO et al., 2012; SHIOGIRI et al., 2012). 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).

Em *P. lineatus* expostos ao DFB, uma das alterações mais frequentes foi a hiperplasia do epitélio lamelar, a qual pode progredir para uma fusão lamelar, e essa pode conduzir a uma notável redução da superfície respiratória, pelo desaparecimento das lamelas e conseqüentemente dificultar a troca de gases e outras funções das brânquias. A hiperplasia de células do epitélio lamelar e fusão das lamelas podem ser atribuídas como uma resposta secundária ao poluente, uma vez que distância entre a água e o sangue é aumentada, dificultando a entrada do poluente na corrente sanguínea. Em um estudo realizado por Paulino e colaboradores (2012), essa alteração foi encontrada também em *P. lineatus* expostos a atrazina. Nesse mesmo trabalho, embora pouco frequente, a fusão lamelar ocorreu nos dois períodos de exposição (48 horas e 14 dias) nas concentrações mais altas ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $25 \mu\text{g.L}^{-1}$).

A proliferação das células de cloreto observada em *P. lineatus* sugere que o DFB altera a regulação osmo-iônica mesmo em concentrações baixas e consideradas terapêuticas. Alteração osmo-iônica foi reportada por Madueno e Martinez (2008) em

exemplares da mesma espécie expostos durante 96 h ao DFB, mas não durante exposição a 6 e 24 h.

A dilatação dos espaços sanguíneos do sistema de células pilares pode conduzir a um processo progressivo de histopatologias como congestão sanguínea, aneurisma e a 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 e afeta o metabolismo aeróbico (FERNANDES e MAZON, 2003; PAULINO et al., 2012). Em *P. lineatus* expostos ao DFB, as alterações vasculares foram poucas e a presença dessas histopatologias foi focal e provavelmente não interferiram de forma muito acentuada no transporte de gases respiratórios.

Os danos observados nas brânquias de *P. lineatus* devido à exposição ao Dimilin®, sua distribuição e gravidade das lesões nesses órgãos dado pelos índices VMA e IAH indicam que o DFB causa alterações branquiais leves a severas dependendo da concentração de exposição (leves a moderadas - exposição a 1 mg L⁻¹ DFB e moderadas a severas - exposição a 2 mg L⁻¹ DFB), em sua maioria reversível e de possível reparo; entretanto se a exposição for mais longa pode ocorrer uma progressão dessas alterações e as funções podem ser afetadas. A brânquia é o órgão de trocas gasosas em peixes e tem papel importante na regulação osmo-iônica, equilíbrio ácido-base e excreção de produtos nitrogenados (MEYERS e HENDRICKS, 1985; FERNANDES et al. 2007). Alterações estruturais nesse órgão podem levar ao desequilíbrio dessas funções.

O fígado é um órgão central, com inúmeras funções vitais do metabolismo básico dos vertebrados (ARIAS et al., 1998; GINGERICH e DALICH, 1982), dentre as quais se inclui a capacidade de acumulação, biotransformação e excreção de compostos xenobióticos (MEYERS e HENDRICKS, 1985). O fígado dos peixes é especialmente

susceptível à ação de produtos químicos devido à lentidão do fluxo sanguíneo em relação ao débito cardíaco. Além disso, o fluxo biliar é cerca de 50 vezes mais lento que o de mamíferos, tornando mais vagarosa a depuração de produtos tóxicos (GINGERICH, 1982).

Dessa forma, os hepatócitos podem ser considerados o alvo de substâncias tóxicas, o que caracteriza o fígado como um órgão biomarcador da poluição ambiental (ZELIKOFF, 1998). Em um fígado saudável, geralmente pode-se observar hepatócitos arranjados em cordões, podendo ou não apresentar vacuolização, núcleo com pequena variação do diâmetro e condensação de cromatina (ZELIKOFF, 1998). Embora o citoplasma dos hepatócitos possa apresentar variados aspectos, inclusive vacuolização dependendo do estado nutricional do indivíduo (RIGOLIN-SÁ, 1998) no caso do presente experimento os animais foram alimentados *ad libitum*. Quando este se encontra bem alimentado, os hepatócitos armazenam quantidades significativas de glicogênio e processam grande quantidade de lipídios.

Em *P. lineatus* expostos ao DFB a presença de hepatócitos com granulações densas e vacuolização citoplasmática foi frequente. As vacuolizações citoplasmáticas podem indicar a existência de regiões com provável concentração de lipídios (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995), ou a combinação de agentes tóxicos com os lipídios intracitoplasmáticos (RODRIGUES, 1998). O acúmulo de lipídios e a diminuição do glicogênio podem prejudicar as atividades metabólicas desempenhadas pelos hepatócitos. Além disso, a presença de núcleos picnóticos progredindo para uma cariólise, focos de degeneração, células leucocitárias no interior de sinusóides sugerem a ocorrência de um possível processo inflamatório.

Neste estudo, as alterações observadas no tecido hepático de *P. lineatus* foram semelhantes àquelas verificadas por outros pesquisadores no fígado de várias espécies

de peixes expostas a diferentes agentes tóxicos, como por exemplo, em *Brachydanio rerio* expostos a concentrações subletais de DDT (SALEH, 1982; RODRIGUES, 1994) em *Piaractus mesopotamicus* expostos ao Roundup® Ready (SHIOGIRI et al., 2012).

Entretanto, *P. lineatus* expostos a 25 mg L⁻¹ de DFB durante 96 h apresentaram predominantemente hipertrofia celular e nuclear, degeneração citoplasmática e nuclear e estagnação biliar e alterações moderadas a severas que podem afetar a função do órgão embora reversíveis se ocorrer a remoção da substância tóxica da água (PEREIRA MADUENHO e MARTINEZ, 2008). A hipertrofia celular e nuclear pode indicar uma intensa atividade metabólica dos hepatócitos e pode ser considerada uma resposta ao estresse, porém, de acordo com TAKASHIMA e HIBIYA (1995) não compromete o funcionamento normal do órgão.

Em geral, as alterações observadas no fígado de *P. lineatus* não são consideradas pesticidas específicas, mas são geralmente associadas como uma resposta dos hepatócitos a substância tóxica (VAN DYK et al., 2007). O aumento da atividade de Glutathione-S-transferase, enzima de detoxificação de fase II e da catalase, enzima antioxidante em *P. lineatus* após 96 h de exposição a 25 mg L⁻¹ de DFB evidencia aumento de atividade dos hepatócitos (MADUENHO e MARTINEZ, 2008), que pode ter ocorrido também no presente estudo.

A ocorrência de distúrbios osmorregulatórios e respiratórios, é causada pela exposição a um ou mais fatores de estresse, sejam eles, agudos ou crônicos, naturais ou xenobióticos, e podem ser identificados através de determinações dos íons plasmáticos (WINKALER et al., 2001; BARCELLOS et al., 2004; CAMARGO e MARTINEZ, 2006; CRESTANI et al., 2007). Distúrbios nas concentrações dos íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ podem indicar alterações no processo de hiper-regulação em peixes de água doce (WENDELAAR BONGA, 1997). A redução da concentração de Cl⁻ no plasma de *P.*

lineatus expostos ao DFB, pode ter ocorrido devido à redução na capacidade de absorção pelas brânquias, devido à inibição da anidrase carbônica. A anidrase carbônica é uma enzima citosólica que cataliza a hidratação do CO₂ produzindo H⁺ e HCO₃⁻ para o transporte de íons e funcionalmente está acoplada a excreção de CO₂ que proporciona a regulação iônica e o equilíbrio ácido-base (GILMOUR, 2012). A inibição da anidrase carbônica, em geral, resulta em redução do influxo de Na⁺ e Cl⁻ devido a redução do gradiente químico transmembrana para os trocadores Na⁺/H⁺ (NH₄⁺) e Cl⁻/HCO₃⁻ alterando o balanço iônico (MAETZ, 1971). Inúmeros agroquímicos inibem a atividade da anidrase carbônica, in vitro e in vivo, exibindo dose dependência (CEYHUN et al., 2010). Contudo, alguns estudos mostram que o transporte de Na⁺ não está diretamente relacionado à inibição da anidrase carbônica segundo Boisen et al. (2003). Devido à participação na excreção de CO₂, a inibição da anidrase carbônica branquial, pode gerar nos peixes um quadro de desequilíbrio respiratório, que resulta em acidose metabólica (HENRY et al., 1988; RANDALL e BRAUNER, 1998; HENRY e SWENSON, 2000; PERRY e GILMOUR, 2012).

Alterações na atividade da enzima Na⁺/K⁺ - ATPase, por exemplo, tem sido considerada como uma das principais causas dos prejuízos hidro-eletrolíticos em *Oncorhynchus mykiss* expostos a chumbo (ROGERS et al., 2003) e em *Prochilodus scrofa* expostos a cobre (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002). O mesmo pode ocorrer com a atividade da H⁺-ATPase. No presente estudo a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase não diferiu significativamente em relação ao grupo controle, o mesmo fato ocorreu em um trabalho de Paulino e colaboradores (2012), em *P. lineatus* expostos a atrazina. Porém a atividade da H⁺-ATPase aumentou significativamente no grupo exposto a 1,0 mg L⁻¹ de Dimilin®.

A atividade da Na^+/K^+ -ATPase, distribuída no sistema tubular formado pela membrana basolateral das células de cloreto, gera uma força eletroquímica para a absorção de Na^+ , via trocador Na^+/H^+ (NH_4^+) (HWANG e LEE, 2007) sendo responsável pela manutenção de um gradiente de Na^+ e K^+ através da membrana da célula. Em peixes de água doce, a H^+ -ATPase (tipo V), localizada na superfície apical da membrana das células pavimentosas e cloreto, facilita a absorção transepitelial de Na^+ , via canais de Na^+ independente da atividade da anidrase carbônica (LIN e RANDALL, 1993; WILSON et al. 2000, KIRSCHNER, 2004)

A proliferação de células cloreto, encontrada na histopatologia das brânquias, evidenciou uma resposta morfológica compensatória para aumentar a absorção de íons e manter a homeostase plasmática. Respostas compensatórias geralmente ocorrem para restaurar ou manter uma dada função branquial para sobrepor um efeito deletério causado por xenobióticos (FERNANDES e MAZON, 2003, FERNANDES et al., 2007, CRESTANI et al., 2007; PAULINO et al., 2012). Contudo, o desequilíbrio iônico ocorreu após 14 dias de exposição em concentrações de DFB consideradas terapêuticas para eliminação de parasitas em aquicultura, situação que pode ser um risco para peixes que vivem em ambientes aquáticos continuamente contaminados com DFB.

Tais situações geram estresse e aumento na taxa metabólica dos peixes (CAMARGO e MARTINEZ, 2007; CRAFFORD e AVENANT-OLDEWAGE, 2010). Com as taxas metabólicas elevadas, aumenta também a sensibilidade do organismo, facilitando a incorporação de contaminantes, por exemplo, através do aumento na permeabilidade branquial (WENDELAAR BONGA, 1997; CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; CAMARGO e MARTINEZ, 2006; CRAFFORD e AVENANT-OLDEWAGE, 2010).

Conclusão

O inseticida Dimilin® (composto ativo: Diflubenzuron 25% - Chemtura) apresenta potencial toxicológico para a espécie *Prochilodus lineatus*, causando alterações em sua fisiologia e morfologia das células, tanto no sangue quanto nas brânquias e fígado. Essas alterações mostraram um efeito dose-resposta, indicando que a espécie avaliada é um ótimo bioindicador, podendo ser utilizada como sentinela em estudos toxicológicos e avaliações ambientais.

Considerações Finais

É importante ressaltar que espécie *Prochilodus lineatus* é muito utilizada para consumo humano, por isso, deve-se dar atenção devida à utilização desse produto em peixes de cultivo, pois pode apresentar potencial toxicológico também para os consumidores, uma vez que o produto pode estar acumulado no corpo desses animais. Portanto, estudos que mostrem a capacidade de bioacumulação do Diflubenzuron em peixes, serão muito importantes para avaliar o real potencial toxicológico desse produto dentro da cadeia alimentar.

Referências Bibliográficas

- ABEL, P.D. Water Pollution. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1989.
- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. 21p., 2004.
- ADAMS, S.M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Am. Fish. Soc., 3, 104-112, 2002.
- AGRAHARI, S.; GOPAL, K. Inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. Pest. Biochem. Physiol., 92, 57-60, 2008.
- AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA M.; CHAND, H.S.; JAIN, S.K.; ATHAR M.; RAISUDDIN S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochim. Biophys. Acta., 1519, 37-48, 2000.
- ALAM, M.; FRANKEL, T. Gill ATPase of silver perch, *Bidyanus bidyanus*, and golden perch, *Macquaria ambigua*: effects of environmental salt and ammonia. Aquaculture, 251, 118-113, 2006.
- ALAZEMI, B.M.; LEWIS, J.N.; ANDREWS, E. B. Gill damage in the freshwater fish, *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selective pollutants: an ultrastructural study. Environ. Technol., 17, 225-35, 1996.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei assessing genotoxicity in water. Mutat. Res., 343, 2-3, 121-135, 1995.
- AMORIM, L. C.A. O Uso dos Biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. Rev. Bras. Med. Trab. Belo Horizonte, 1, 124-132, 2003.
- ARIAS, I.M.; JAKOBY, W.B.; POPPER, H.; SCHACHTER, D.; SCHAFRITZ, D.A. The liver: Biology and Pathobiology. New York: Raven Press, 1998.
- BAINY, A.C.D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. Ciência e Cultura, 45, 10-11, 1993.
- BARCELLOS, L.J.G., KREUTZ, L.C., SOUZA, C., RODRIGUES, L.B., FIOREZE, I., QUEVEDO, R.M., CERICATO, L., SOSO, A.B., FAGUNDES, M., CONRAD, J., LACERDA, L.A., TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture 237, 229-236, 2004.
- BARRIONUEVO, W.R.; FERNANDES, M.N. Critical thermal maxima and minima for curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner) of two different sizes. Aquacult. Res. 26, 447-450, 1995.

- BEDOR, C.N.G. et al. Vulnerabilidades e situações de riscos relacionadas ao uso de agrotóxicos na fruticultura irrigada. *Rev. Bras. Epidemiol.* 12, 1, 39-49, 2009.
- BEHMER, A.O.; TOLOSA, E. M.C.; FERITAS-NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 1ª edição, Ed. Edusp/edart, 239p., 1976.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Méd.*, 61, 882-888, 1963.
- BIANCHINI, A. P.; CARVALHO DE CASTILHO, P. Effect of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na⁺, K⁺-ATPase of the Estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1951 (Decapoda-Grapsidae), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62, 63-69, 1999.
- BOISEN, A.M.Z.; AMSTRUP, J.; NOVAK, I.; GROSELL, M. Sodium and chloride transport in soft water and hard water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta.* 1618, 207-218, 2003.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- BRAGA, I.A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* Resistance to Temephos during 2001 in Several Municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 99, 2, 199-203, 2004.
- BORGES, R.A.; ARRUDA, W.; FERNANDES DE OLIVEIRA, E.S.; CAVASIN, G.M.; GARCIA DA SILVA, H.H.; GARCIA DA SILVA, I. Mecanismos da ação larvicida do diflubenzuron sobre *Aedes aegypti* evidenciados pelas alterações ultraestruturais. *Rev. Patol. Trop.*, 4, 222-232, 2012.
- BURKA, J.F.; HAMMEL, K.L.; HORSEBERG, T.E.; JOHNSON, G.R.; RAINNIE, D.J.; SPEARE, D.J. Drugs in salmonid aquaculture – A review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 20, 333- 349, 1997.
- CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, 61-69, 2006.
- CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.*, 5, 3, 327-336, 2007.
- CAVALCANTE, A.L.M. Parâmetros Sanguíneos de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) no Monitoramento Ambiental do Chumbo. Dissertação de mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2009.
- CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52, 83-91, 2002.

CEYHUN, S.B.; SENTÜRK, M.; ERDOGAN, O.; KÜFREVIÖGLU, Ö.I. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pesticide Biochem. Physiol.* 97, 177–181, 2010.

CHOE, K.P.; EDWARDS, S.; MORRISON-SHETLAR, A.I.; TOOP, T.; CLAIBORNE, J.B. Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase in mitochondrion-rich cells of the atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*) gill. *Comp. Biochem. Physiol.*, 124, 161–168, 1999.

CRAFFORD, D.; AVENANT-OLDEWAGE, A. Bioaccumulation of non-essential trace metals in tissues and organs of *Clarias gariepinus* (Sharptooth catfish) from the Vaal River system – strontium, aluminium, lead and nickel. *Water SA*, 36, 5, 621-640, 2010.

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.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*, 30, 235-241, 1981.

DAVIES, I.M.; RODGER, G.K.; REDSHAW, J.; STAGG, R.M. Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. *ICES Journal of Marine Science*, 58, 477-485, 2001.

EPSTEIN, F.H.; SILVA, P.; KORMANIK, G. Role of Na⁺/K⁺-ATPase in chloride cell function. *Am. J. Physiol.*, 238, R246–R250, 1980.

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

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

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.; MORON, S.E.; SAKURAGUI, M.M. Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function. In: Fernandes, M.N., Glass, M.L., Rantin, F.T., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Respiration and Environment*. Science Publishers Inc., Enfield, 93–120, 2007.

FERRARO, M.V.M. Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERREIRA, G.R.; NEPOMUCENO, J.C. Poluição do Rio Santa Catarina no município de Vazante (MG) detectada por meio do teste do micronúcleo em peixes. *Perquirere*. Edição 5, Ano 5, jun, 2008.

FISHER, S.A.; HALL, L.W. Environmental concentrations and aquatic toxicity data on difluzuron (Dimilin). *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 45–79, 1992.

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

GIBBS, A.; SOMERO, G.N. Pressure adaptation of Na⁺/K⁺-ATPase in gills of marine teleosts. *J. exp. Biol.* 143, 475-492, 1989.

GILMOUR, K.M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills. *Resp. Physiol. & Neurobiol.*, 184, 223-230, 2012.

GILMOUR, K.M.; PERRY, S.F. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 1647-1661, 2009.

GINGERICH, W.H. Hepatic toxicology of fishes. In: WEBER, L.F. (ed.) *Aquatic toxicology*, New York: Plenum Press. 55-105, 1982.

GINGERICH, W.H.; DALICH, G.M. An evaluation of liver toxicity in rainbow trout following treatment with monochlorobenzene. *Proc. West. Pharmacol.* 21, 475-480, 1982.

GONZALEZ, R.J.; COOPER, J.; HEAD, D. Physiological responses to hyper-saline waters in sailfin mollies (*Poecilia latipinna*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 142A, 397-403, 2005.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLISON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.*, 26, 483–495, 2001.

GRISOLIA C.K.; STARLING F.L.R.M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mut. Res.* 491, 39-44, 2001.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione s-Transferases. The first enzymatic in mercapturic acid formation. *The J. of Biol. Chemistry*, 249, 22, 7130-7139, 1974.

HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. G. Dietary selenium on erythrocyte and glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 104, 580-567, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in biology and medicine*. Nova York: Oxford University Press, 1, 851p, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3^o ed. UK: Oxford University Press. 936p, 2000.

HEATH, A.G. Water pollution and fish physiology. 2.ed. CRC Press, Lewis publishers. 342p, 1995.

HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELDY, J.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.H.; MACGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18, 277-291, 1991.

HENRY, R.P.; SMATRESK, N.J.; CAMERON, J.N. The distribution of branchial carbonic anhydrase and the effects of gill and erythrocyte carbonic anhydrase inhibition in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Exp. Biol.* 134, 201-218, 1988.

HENRY, R.P.; SWENSON, E.R. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate as exchange organs. *Resp. Physiol.* 121, 1-12, 2000.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. In: Hugget, R., R. Kimerle, P. Mehrle & H. Bergman (Eds.). Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers, 155-195, 1992.

HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*, 8, 51-66, 1990.

HOFTMAN, R.N.; RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.*, 104, 147–152, 1982.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. *Free. Rad. Res.*, 28, 593-600, 1998.

HORISBERGER, J. D. Recent insights into the structure and mechanisms of the sodium pump. *Physiology*, 19, 377–387, 2004.

HWANG, P-P.; LEE, T-H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Com. Biochem. Physiol. A* 148, 479-497, 2007.

ITUASSÚ, D.R.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; CRESCÊNCIO, R.; CAVERO, B.A.S.; GANDRA, A.L. Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40, 255-259, 2005.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange – Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids*, 26, 853-856, 1992.

KIRSCHNER, L.B. The mechanism of sodium chloride uptake in hyper regulating aquatic animals. *J. Exp. Biol.*, 207, 1439-1452, 2004.

KÖHLER, A.; DEISEMANN, H.; LAURITZEN, B. Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog.*, 91, 141 – 153, 1992.

KULTZ, D.; SOMERO, G.N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *J. Exp. Biol.*, 98, 1883–1894, 1995.

LIN, C.H.; TSAI, R.S.; LEE, T.H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comp. Biochem. Physiol.*, 138, 287– 295, 2004.

LIN, H.; RANDALL, D.J. H⁺-ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitivity and environmental and hormonal regulation. *J. Exp. Biol.* 180, 163-174. 1993.

LIN, H.; PFEIFFER, D.C.; VOGL, A.W.; PAN, J.; RANDALL, D.J. Immunolocalization of H⁺-atpase in the gill epithelia of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 195, 169–183, 1994.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-276, 1951.

LUDWIG, G.M. Effects of Trichlorfon, fenthion and diflubenzuron on the zooplankton community and on production of reciprocal-cross hybrid striped bass fry in culture ponds. *Aquaculture, Amsterdam.* 110, 301-319, 1993.

LUVIZOTTO-SANTOS, R.; ELER, M.N.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; VIEIRA, E.M. O uso de praguicidas nas pisciculturas e pesqueiros situados na bacia do Rio Mogi-Guaçu. *B. Inst. Pesca, São Paulo*, 35, 3, 343–358, 2009.

MABILIA, R.G.; SOUZA, S.M.G. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. *Acta Sci. Biol. Sci. Maringá*, 28, 2, 159-163, 2006.

MACHADO, M.R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde, Londrina*, 1, 63-76, 1999.

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

MAETZ, J. Fish gills: mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. *Philosophical Trans. Royal Soc London. B: Biol. Sc.* 262, 209–249, 1971.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. *et al.* Editores. Londrina, PR : M. E. Medri, 551-577, 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; SOUZA, M.M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)*, 133, 151-160, 2002.

MASUI, D.C.; FURRIEL, R.P.M.; SILVA, E.C.C.; MANTELATTO, F.L.M.; MCNAMARA, J.C.; BARRABIN, H.; SCOFANO, H.M.; FONTES, C.F.L.; LEONE, F. A. Gill microsomal (Na⁺K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. *Int.J. Biochem. Cell Biol.*, 37, 2521–2535, 2005.

MAZON, A.F.; FERNANDES, M.N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63, 797-804, 1999.

MAZON, A.F.; MONTEIRO, E.A.S.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol.*, 62, 621–631, 2002.

MAZON, A.F.; NOLAN, D.T.; LOCK, R.A.C.; FERNANDES, M.N.; WENDELAAR BONGA, S.E. A short-term *in vitro* gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Toxicol In Vitro*, 18, 691-701. 2004.

MCCORMICK, S.D. Methods for nonlethal gill biopsy and measurements of Na⁺,K⁺-ATPase activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 656–658, 1993.

MELANCON, M.J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: *Handbook of ecotoxicology* (HOFFMAN, D.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J.).Ed. Boca raton. Lewis, 1995.

MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: Janete Brigante; Evaldo L. G. Espíndola. (Org.). *Limnologia Fluvial - Um Estudo no Rio Mogi-Guaçu*. São Carlos: Rima Editora, 149-180, 2003.

MERSCH J.; BEAUVAIS, M.N. The micronucleus assay in the *Zebra mussel*, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mut. Res.* 393,141-149, 1997.

MEYERS, T.R.; HENDRICKS, J.D. Histopathology. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.) *Fund. of Aquatic Toxicol.: Methods and Applications*, 283 – 331, 1985.

MORRISON J.F.; GUYNN, S.R.; SCOFIELD, M.A.; DOWD, F.J.; PETZEL, D.H. Warm acclimation changes the expression of the Na⁺,K⁺-ATPase _ subunit isoforms in Antarctic fish gills. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 333, 129-139, 2006.

NEPOMUCENO, J.C.; FERRARI, I.; SPANÓ, M.A.; CENTENO, A.J. Detection of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of *Cyprinus carpio* Exposed to Metallic Mercury. *Env. and Mol. Mut.*, 30, 293-297, 1997.

OPDYKE, J.C.; MILLER, R.W.; MENZER, R.E. Metabolism and fate of diflubenzuron in swine. *J. Agric. Fd. Chem.*, 30, 1223-1227, 1982.

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*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 80, 6-13, 2012.

PEAKALL, D.B. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. And Ecotoxicol. News Journal*. [s.n.], 50-60, 1994.

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 jahu, *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821) (Pisces, Pimelodidae). *Zoociências* 10, 51-54, 2008.

PERRY S.F.; GILMOUR, K.M. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 154, 199-215, 2006.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. *Sublethal and Chronic Effects of pollutants on Freshwater fish*. Oxford: Fishing News Books, 30, 339-352, 1994.

PRASAD, I. Mutagenic effects of the herbicide 3', 4'-dichloropropioanilide and its degradation products. *Canadian J. Microbiol.*, 16, 5, 369-372, 1970.

QUABIOUS, E.S.; BALM, S.E.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 472-482, 1997.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*. New York: Hemisphere, 665, 1985.

RANDALL, D.J.; BRAUNER, C. Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 3-8, 1998.

RANDALL, D.J.; LIN, H. Effects of water pH on gas and ion transfer across fish gills. In *Fish Ecophysiology* (ed. J. C. Rankin and F. B. Jensen), London: Chapman and Hall, 265-275, 1993.

RAMSDORF, W.A.; FERRARO, M.V.M.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A.; COSTA, J.R. M.; CESTARI, M.M. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ. Monit. Assess.*, 158, 77-85, 2009.

RIGOLIN-SÁ, O.R. Avaliação da toxicidade do herbicida Roundup (Glifosato) e do acaricida Omite (Propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes). São Carlos. 309p. (Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos), 1998.

RODRIGUES, E.L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. *Rev. Bras. Zool.*, 15, 2, 441-450, 1998.

RODRIGUES, E.L. Alterações morfológicas em hepatócitos de *Brachydanio rerio* (HamiltonBuchanan, 1822, 1823) exposto à ação do organofosforado Dimetoato 500 em dose subletal. Curitiba. 77p. (Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná), 1994.

ROGERS, J.T.; RICHARDS, J.G.; WOOD, C.M. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 64, 215 – 234, 2003.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M.M.; PAULINO, M.G.; FERNANDES, M.F. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. *Environ. monit. assess.* DOI 10.1007/s10661-010-1810-z, 2010.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H. Aspectos fisioecológicos de *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus* (Teleósteos) do Reservatório da UHE de Furnas, MG: Avaliação morfofuncional das brânquias e variáveis hematológicas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, 2008.

SAKURAGUI, M.M.; SANCHES, J.R.; FERNANDES, M.N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol.* 173, 309-317, 2003.

SALEH, M.A. 1982. Identification and quantitative determination of chlorinated pesticides. *J. Environ. Sci. Health, Part B.*, 17 (1), 35-42.

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 Sci. Anim. Sci. Maringá*, 27 (2), 297-302, 2005.

SCHOLZ, T. Parasites in cultured and feral fish. *Vet. Parasitol.*, 84, 317-335, 1999.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluated contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.* 6, 75 – 86, 1997.

SENDER, S.; BÖTTCHER, K.; CETIN, Y.; GROS, G. Carbonic anhydrase in the gills of seawater-and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: purification, characterization, and immunohistochemical localization. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47, 1, 43-50, 1999.

SERIANI, R.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; NAPOLEÃO, S.R. Hematology, micronuclei and nuclear abnormalities in fishes from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. *Acta Sci. Biol. Sci.*, Maringá, 33, 1, 107-112, 2011.

SHIKANO, T.; FUJIO, Y. Immunolocalization of Na⁺/K⁺-atpase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. *J. Exp. Biol.*, 201, 3031–3040, 1998.

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*. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 34, 388-396, 2012.

SIMONATO, J.D.; GUEDES, C.L.B.; MARTINEZ, C.B. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69, 112–120, 2008.

STEGEMAN, J.J.; LECH, J.J. Cytochrom p-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Persp.*, 90, 93 – 100, 1991.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology: normal and pathological features. 2. ed. Tokyo: Kodanska / Stuttgart: Fischer Verlag. 195p, 1995.

TAKASUSUKI, J.; ARAUJO, M.R.R.; FERNANDES, M.N. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodondidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 1075–1082, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “Pesque-Pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *Biosci. J.*, 19, 103-110, 2003.

TEH, S.J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.*, 37, 51 – 70, 1997.

THOMAS, P. Molecular and Biochemical Responses of Fish to Stressors and Their Potential Use in Environmental Monitoring. *Amer. Fish. Soc. Symp.*, 8, 9 – 28. 1990.

THOMSON, A.J.; SARGENT, J.R. Changes in the levels of chloride cells and (Na⁺⁺K⁺)-dependent ATPase in the gills of yellow and silver eels adapting to sea water. *J. Exp. Zool.*, 200, 33–40, 1977.

TOMLIN, C.D.S. The Pesticida Manual. A Word Compendium. British Crop Protection Council, 11 Ed. 1606p., 1997.

USEPA. Prevention Pesticides and Toxic Substances. Unites States Environmental Protection Agency, Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reds/factsheets/0144fact.pdf>. 1997.

VAN DYK, J.C.; PIETERSE, G.M.; VAN VUREN, J.H.J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 66, 3, 432-440, 2007.

VAN DYK, J.C. Fish histopathology as a monitoring tool for aquatic health: a preliminary investigation. 47f. Tese (Doutorado) - University of Johannesburg, Johannesburg, South Africa, 2005.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44, 69-84, 1997.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625, 1997.

WESTER, P.W.; CANTON, J.H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100, 115-117, 1991.

WESTER, P.W.; VAN DER VEN, L.T.M.; VETHAAK, A.D.; GRINWIS, G.C.M.; VOS, J.G. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 11, 289-295, 2002.

WILHELM-FILHO, D.; MARCON, J.L. Antioxidant defenses in fish of the amazon. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D. J. (Eds.) *Physiology and biochemistry of the fishes of the amazon*. Manaus: INPA, 299-312. 1996.

WILSON, J.M.; LAURENT, P.; TUFTS, B.L.; BENOS, D.J.; DONOWITZ, M.; VOGL, A.W.; RANDALL, D.J. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: an immunological approach to ion-transport protein localization. *J. Exp. Biol.* 203, 2279-2296, 2000.

WINKALER, E.U. Aspectos ecotoxicológicos dos inseticidas Diflubenzuron e Teflubenzuron para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal – SP, 2008.

WINKALER, E.U.; SANTOS, T.R.M.; MACHADO-NETO, J.G.; MARTINEZ, C.B.R. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.C*, New York, 145, 2, 2007.

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

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. Editora Rima, São Carlos, 478p, 2006.

ZAR, J.H. *Bioestatistical Analysis*. Ed. Prentice Hall, 2009.

ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicology*, 129, 1, 63-71, 1998.