

# Análise do intestino delgado de *Danio rerio* exposto a organofosforado e detergente: um estudo histológico e morfométrico

*Analysis of the small intestine of *Danio rerio* exposed to organophosphate and detergent: a histological and morphometric study*

Hélio Batista dos Santos<sup>1</sup>; Letícia Vieira<sup>1</sup>; Stênio Nunes Alves<sup>2</sup>; Ralph Gruppi Thomé<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João Del Rei, Laboratório de Processamento de Tecidos – LAPROTEC. Campus Centro Oeste – Divinópolis, MG.

<sup>2</sup>Universidade Federal de São João Del Rei, Insetário. Campus Centro Oeste – Divinópolis, MG

## Resumo

Pesticidas são substâncias químicas amplamente utilizadas para o controle de pragas, enquanto que detergentes têm sido utilizados na indústria e atividades domésticas. O lançamento e a associação desses compostos no ambiente aquático pode representar riscos para os seres humanos e animais selvagens. Uma das vias de absorção dessas substâncias em peixes é o trato digestivo. Diante disso, o presente trabalho objetivou analisar as alterações histológicas em intestino delgado de *Danio rerio* submetidos ao Temephos (organofosforado), ao dodecil sulfato de sódio (SDS), e à associação desses dois compostos. Para alcançar os objetivos propostos, 12 exemplares adultos adquiridos comercialmente foram aclimatados por uma semana. Em seguida, os animais foram divididos em quatro grupos: controle; Temephos (1 ppm); SDS (2 ppm) e Temephos-SDS (1ppm + 2 ppm), os quais foram expostos por 96 horas. Fragmentos de intestino delgado foram fixados em líquido de Bouin, corados com hematoxilina-eosina ou ácido periódico/reactivo de Shiff. Não houve modificações na arquitetura do intestino delgado nos grupos experimentais. Entretanto, foi observada uma maior quantidade de células calciformes nos peixes submetidos ao Temephos e ao Temephos-SDS, em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). A altura das vilosidades intestinais nos grupos SDS e Temephos-SDS foi menor em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). A espessura das vilosidades e altura dos enterócitos foi menor nos grupos Temephos e Temephos-SDS, assim como a altura da borda estriada no grupo Temephos, sempre em relação ao controle. Resultados obtidos indicam que os tratamentos promoveram modificações histológicas no intestino delgado de *D. rerio* que podem comprometer a homeostase.

**Palavras-chave:** Toxicologia, organofosforado, surfactante, epitélio intestinal, células calciformes.

*Autor correspondente:*

*Hélio Batista dos Santos*

*Endereço: Rua Sebastião Gonçalves Coelho, 400 CEP:35501-296  
Divinópolis, Minas Gerais.*

*Telefone: +55 37 3221 1610*

*E-mail: hbsantos@ufsj.edu.br*

Recebido em: 08/09/2016

Revisado em: 21/09/2016

Aceito em: 23/09/2016

Publicado em: 07/12 /2016

## Abstract

*Pesticides are chemicals widely used to control of pests. Detergents are used in the industrial and domestic activities. The release and the association of these compounds in the aquatic environment may to promote risks to humans and wild animals. One of pollutant absorption pathways in fish is the digestive tract. Thus, this work aimed to analyze histological changes in the small intestine of *Danio rerio* submitted to Temefos, to sodium dodecyl sulfate (SDS), and the association of these two compounds. To achieve the proposed objectives, 12 adult specimens of *D. rerio* were purchased commercially and acclimated for one week. Then the animals were divided in four groups: control; Temefos (1 ppm); SDS (2 ppm), and Temefos-SDS (1ppm + 2 ppm), which were exposure for 96 hours. Samples of small intestine were fixed in Bouin's fluid, stained with hematoxylin-eosin or periodic / reactive acid Schiff. There were no changes in the histology of the small intestine in the experimental groups. However, a greater number of goblet cells was observed in fish submitted to Temefos and Temefos-SDS compared to control ( $p < 0.05$ ). Height of intestinal villi was lower in SDS and Temefos-SDS groups compared to the control ( $p < 0.05$ ). Thickness of the villi and height of enterocytes was lower in Temefos and Temefos-SDS groups, as well as the height of the striated border in Temefos group, compared to control. The findings indicate that the treatments caused histological changes in small intestine of *D. rerio* that can to compromise the homeostasis.*

**Keywords:** *Toxicology, organophosphate, surfactant, intestinal epithelium, goblet cells.*

## Introdução

Alterações biológicas podem ser desencadeadas pela contaminação com poluentes e podem ser reconhecidas por meio da análise de parâmetros metabólicos e enzimáticos. Além disso, também é possível reconhecê-las por alterações histológicas em órgãos de animais contaminados<sup>1-3</sup>. Atualmente, o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, o que está relacionado com a sua intensa exploração agrícola<sup>4</sup>. A utilização desses produtos químicos intensifica a produção e diminui a perda agrícola em áreas cultivadas<sup>5</sup>. Apesar de seus benefícios, menos de 1% do total dos compostos aplicados atingem o seu alvo, além disso, muitos pesticidas, assim como seus metabólitos, têm sido encontrados no fundo e na superfície de águas, no solo e na atmosfera<sup>6-8</sup>. Portanto, o lançamento dos pesticidas no ambiente cria potenciais impactos adversos à saúde dos seres humanos e de animais selvagens não-alvo<sup>9</sup>.

O Temefos ( $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$ ) é inseticida e larvicida da classe dos organofosforados que tem como mecanismo de ação a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso<sup>10</sup>. A consequência dessa inibição é o acúmulo de acetilcolina que pode causar alterações nos tecidos nervoso, muscular, endócrino e imunológico<sup>11</sup>. Além disso, peixes expostos ao pesticida organofosforado (Diclorvós) apresentaram fusão lamelar e aneurisma nas brânquias; e hepatócitos vacuolizados, edemaciados e sinusóides dilatados no fígado<sup>12</sup>. Embora apresente baixa solubilidade em água, o Temefos pode permanecer durante dias no meio ambiente e semanas nos tecidos afetados<sup>10, 13</sup>.

Os detergentes sintéticos têm sido muito utilizados em várias práticas humanas desde a

indústria até atividades domésticas. É, então, uma das principais fontes de contaminação do ambiente aquático criando potencial efeito adverso sobre os animais aquáticos<sup>2,3,14</sup>. O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente não iônico constituído de uma mistura de alquilsulfato de sódio, principalmente de laurilsulfato de sódio e ao contrário do Temefos, ele é amplamente solúvel em água. Nesse sentido, os efluentes domésticos e os industriais ricos em detergentes em associação com os lançamentos de pesticidas podem amplificar os efeitos deletérios dessas substâncias sobre os organismos aquáticos.

O intestino desempenha várias funções importantes no sistema digestório e é, conseqüentemente, um órgão chave para homeostase do organismo. Conseqüentemente, a exposição a xenobióticos pode comprometer a função intestinal por alterar os componentes histológicos associados a esse órgão<sup>15</sup>. Assim como nos mamíferos, o intestino de algumas espécies de peixe também apresentam porção delgada e outra grossa<sup>16-17</sup>. O intestino delgado tem como função a absorção de nutrientes, secreção de enzimas que auxiliam na digestão e de hormônios. Já o intestino grosso tem com principais funções a absorção de líquidos e a secreção de muco<sup>16</sup>.

Uma vez que o estudo da ação de organofosforados e de surfactantes no intestino delgado de teleósteos são escassos, o objetivo do presente trabalho foi descrever e quantificar as modificações histológicas de intestino delgado de *Danio rerio* expostos ao Temefos, SDS e suas combinações.

## Metodologia

### Desenho experimental

Para o ensaio toxicológico, doze exemplares adultos da espécie *D. rerio* obtidos comercialmente foram utilizados. Na primeira semana, foi realizada a aclimação dos peixes, os quais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial e mantidos em aquários com água decolorificada e aerada. O ensaio experimental foi realizado utilizando-se quatro aquários (n=3): Grupo Controle; Grupo Temephos (1 ppm); Grupo SDS (2 ppm); Grupo Temephos-SDS (1 ppm + 2 ppm). O experimento foi conduzido por 96 h no sistema estático de exposição, os aquários tinham volume de três litros e foram mantidos à temperatura ambiente, oxigenação constante, fotoperíodo 12/12 horas e os peixes alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Protocolo nº 23/2012 Comissão de ética de animais CEUA UFSJ). A concentração de Temephos utilizada foi baseada na recomendação do Ministério da Saúde com base nas diretrizes do Programa Nacional de Controle da Dengue no Brasil<sup>18</sup>. A concentração de SDS seguiu uma aproximação dos valores médios encontrados nos efluentes industriais e domésticos do Sudeste e Sul do Brasil<sup>19-20</sup>.

### Processamento histológico

Após o ensaio toxicológico, os animais foram anestesiados com benzocafina (100 mgL<sup>-1</sup>) para eutanásia e os fragmentos de intestino anterior foram coletados e fixados em líquido de Bouin por 24h. Em seguida, as amostras biológicas foram submetidas às técnicas histológicas de rotina, incluídas em parafina, microtomia de 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE). Além disso, seções de intestino delgado também foram submetidas à técnica histoquímica do ácido periódico e reativo de Schiff (PAS) para identificação de mucopolissacarídeos neutros.

### Morfometria

Para a contagem de células caliciformes, medida da altura de células epiteliais de revestimento (enterócitos), espessura e altura de vilosidades intestinais, e espessura da borda estriada, foram capturadas 8 imagens das seções histológicas do intestino delgado por animal. As análises morfométricas foram realizadas por meio do analisador de imagens Axion Vision 4.8.2 da Zeiss.

### Análise estatística

Os dados gerados foram quantificados e apresentados como médias ± D.P. (desvio padrão da média). Foi realizada uma análise de variância de uma via (ANOVA) e posterior comparação

Dos valores obtidos com o post-test de Tukey. No caso de comparações entre diferentes grupos experimentais, foi realizado o teste-*t* de Student não pareado após análise de variância. O método de Kolmogorov e Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados e o Teste F foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Graph Pad InStat versão 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Foram consideradas somente as diferenças ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ )

## Resultados

### Histologia do intestino delgado

Nos animais estudados, o intestino foi composto por 3 camadas: a mucosa, a submucosa e a muscular (**FIGURAS 1A-B**). Na mucosa, o epitélio de revestimento observado foi do tipo colunar simples, constituído de células poliédricas com borda estriada e notada presença de células caliciformes (**FIGURAS 1D-E**). Além disso, foram registradas a presença de alguns linfócitos intraepiteliais (**FIGURA 1C**). A lâmina própria apresentou tecido conjuntivo frouxo (**FIGURA 1B**). A camada muscular foi constituída por células musculares lisas em disposição longitudinal (**FIGURA 1F**). Não foram registradas figuras de apoptose e necrose na parede intestinal nos grupos experimentais.

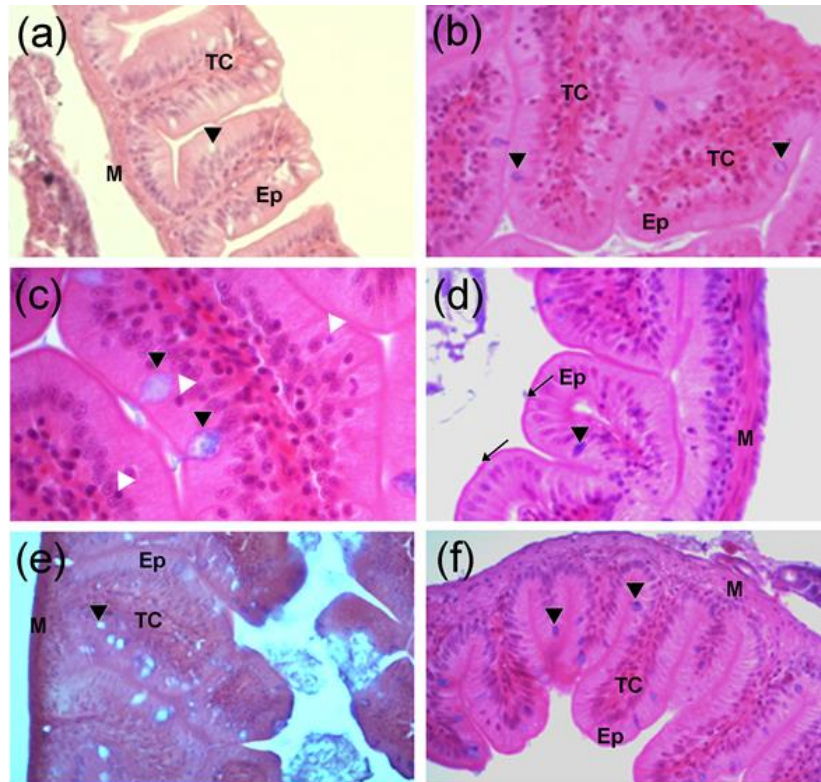
### Histoquímica do PAS

As células caliciformes foram PAS positivas (**FIGURA 2**). A borda estriada apresentou marcação em todos os grupos de estudo (**FIGURAS 2B-D**). Além disso, a membrana basal mostrou-se PAS positiva contornando as vilosidades intestinais (**FIGURAS 2B-D**). A membrana basal associada ao tecido epitelial de revestimento e às células musculares lisas apresentou forte reação pelo PAS.

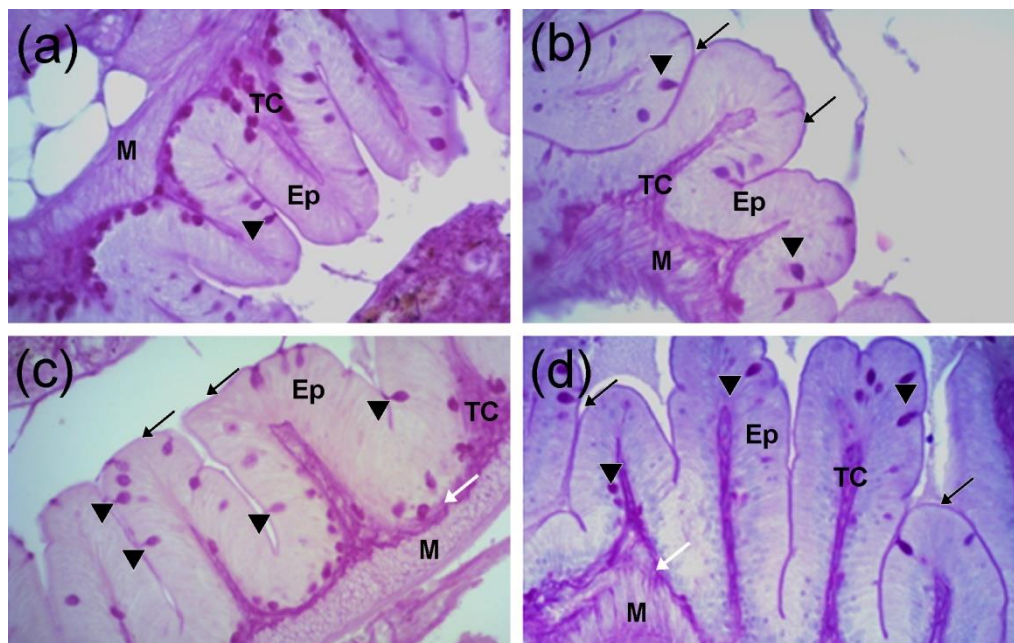
### Morfometria

O número de células caliciformes foi maior nos grupos tratados com Temephos e Temephos-SDS em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) (**FIGURA 3**). A altura da vilosidade intestinal foi menor nos grupos SDS e Temephos-SDS em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A espessura da vilosidade intestinal e a altura dos enterócitos nos grupos Temephos e Temephos-SDS apresentaram menores valores comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A altura da borda estriada dos enterócitos também foi menor no grupo Temephos do que no grupo controle (**TABELA 1**).

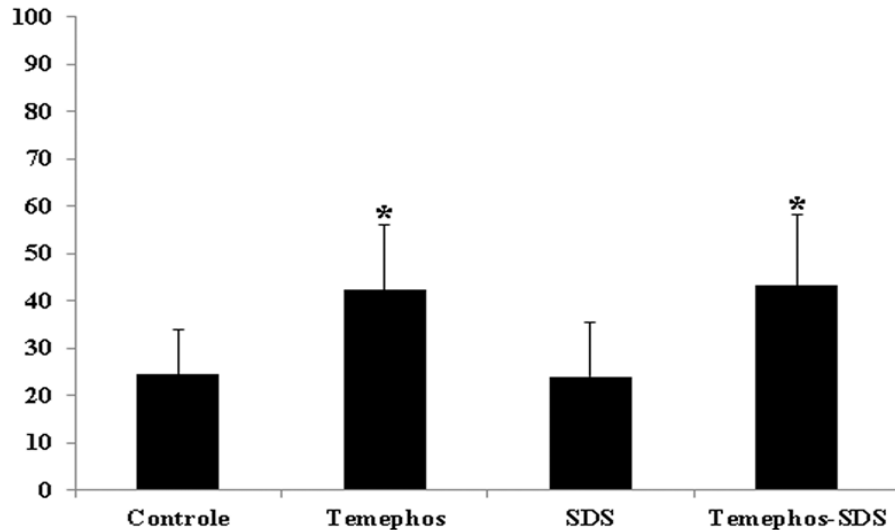




**FIGURA 1:** Secções histológicas de intestino de *Danio rerio* coradas pelo HE. A-C cortes de intestino do grupo controle. D-E grupos tratados com SDS, Temephos, Temephos-SDS, respectivamente. Ep = tecido epitelial de revestimento simples prismático com borda estriada e células caliciformes; TC = tecido conjuntivo frouxo da mucosa intestinal; M = camada muscular lisa; Cabeça de setas pretas = células caliciformes; cabeças de setas brancas = linfócitos intraepiteliais; Setas = borda estriada. A, B, D-F aumento de 200X. C aumento de 400X.



**FIGURA 2:** Secções histológicas de intestino de *Danio rerio* coradas com a histoquímica do PAS. A - controle. B-C SDS. D - Temephos. Ep = tecido epitelial de revestimento simples prismático com borda estriada e células caliciformes; TC = tecido conjuntivo frouxo da mucosa intestinal; M = camada muscular lisa; Cabeça de setas = células caliciformes PAS-positivas; Setas pretas = borda estriada PAS-positiva; Setas brancas = membrana basal PAS-positiva. A-D Aumento de 200X.



**FIGURA 3.** Frequência de células caliciformes em intestino de *Danio rerio* controle e grupos tratados SDS, Temephos e Temephos-SDS. Asterisco indica diferença significativa entre os grupos.

**TABELA 1.** Altura e espessura das vilosidades, altura de enterócitos e altura da borda estriada no intestino delgado de *Danio rerio*.

Tratamento	Altura das vilosidades	Espessura das vilosidades	Altura dos enterócitos	Altura da borda estriada
Controle	138,9 ±23,7 <sup>a</sup>	67,6±7,3 <sup>a</sup>	26,1±3,9 <sup>a</sup>	2,2±0,6 <sup>a</sup>
Temephos	112,9±13,5 <sup>ab</sup>	50,8±9,9 <sup>b</sup>	19,6±3,7 <sup>b</sup>	1,8±0,3 <sup>b</sup>
SDS	103,1±26,4 <sup>b</sup>	68,9±13,2 <sup>a</sup>	25,9±3,1 <sup>a</sup>	2,2±0,3 <sup>a</sup>
Temephos-SDS	104,1±23,9 <sup>b</sup>	58,9±5,9 <sup>c</sup>	24,2±2,9 <sup>c</sup>	2,3±0,4 <sup>a</sup>

Os dados são expressos como média ± desvio padrão. Na mesma coluna, letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

## Discussão

Embora seja de conhecimento que os pesticidas possam causar danos celulares e teciduais a diversos órgãos comprometendo a homeostase do organismo, trabalhos de toxicologia que visam descrever a ação de organofosforados e detergentes além de suas associações no intestino delgado de peixes ainda são escassos na literatura.

No presente trabalho, em todos os grupos experimentais, o intestino delgado de *D. rerio* mostrou um padrão histológico normal<sup>16-17</sup>. Entretanto, a análise morfométrica do intestino delgado de *D. rerio*, revelou que a altura das vilosidades intestinais nos grupos SDS e Temephos-SDS foi menor em relação ao grupo controle. A espessura das vilosidades e altura dos enterócitos foram menores nos grupos Temephos e Temephos-

SDS, assim como a altura da borda estriada no grupo Temephos, quando comparado ao controle. Apoptose, necrose ou processo inflamatório não foram identificados na parede intestinal dos animais de nenhum dos tratamentos. Por outro lado, em *Corydoras paleatus* expostos de maneira aguda (96h) ao Folidol 600 (paration metílico), um pesticida organofosforado, foram observados a ocorrência de alterações na mucosa intestinal com vilosidades desorganizadas, um processo inflamatório e vacuolização lipídica dos enterócitos. Além disso, foram observadas necrose das células epiteliais, descamação, infiltração de linfócitos e hiperplasia de enterócitos, tais modificações foram descritas apenas após administração do inseticida através dos

alimentos contaminados<sup>21</sup>. Em *Channa punctatus* exposta ao glifosato foi descrito a perda das pregas da mucosa na parede intestinal e desorganização de microvilosidades das células absorptivas, além da diminuição de lipases, proteases e amilases<sup>22</sup>. Além disso, nessa mesma espécie quando submetida ao carbamato, observou-se uma redução na absorção de nutrientes e diminuição na atividade de enzimas associadas a borda estriada<sup>23</sup>.

Além dos pesticidas, os detergentes biodegradáveis comerciais também têm mostrado efeitos adversos em órgãos e tecidos de peixes teleosteos de água doce. Perda da arquitetura normal da mucosa tais como desorientação ou desorganização de vilosidades intestinais, processo inflamatório na mucosa foram resultados observados após a exposição aguda a surfactantes catiônicos em *Sparus aurata*<sup>24</sup>. Além do intestino, foram descritas várias alterações hepáticas tais como vacuolização citoplasmática, redução de glicogênio e deslocamento nuclear nos hepatócitos, e recrutamento de macrófagos após a exposição a 1ppm de detergentes biodegradáveis comerciais por 7 e 30 dias em *Astyanax altiparanae* e em *Prochilodus lineatus*<sup>2</sup>. De fato, Ciamarro e colaboradores também reportaram os efeitos de detergentes biodegradáveis comerciais na histologia da musculatura esquelética peitoral também de *A. altiparanae* e em *P. lineatus*. Eles observaram que a exposição a 1 ppm de detergente comercial por 30 dias promoveu o aumento significativo do diâmetro das fibras musculares brancas peitorais e diminuição significativa das áreas de fibras colágenas tipo I e III na musculatura vermelha peitoral quando comparado ao grupo controle em ambas espécies<sup>3</sup>. Portanto, os achados do presente trabalho sugerem que 2 ppm de SDS e 1 ppm de Temephos possam causar diminuição na absorção de nutrientes e consequentemente modificações na homeostase de *D. rerio*.

A histoquímica do PAS mostrou positividade para membrana basal das células epiteliais, das células musculares lisas e citoplasma de células caliciformes. A contagem de células caliciformes foi maior no intestino delgado de *D. rerio* nos grupos tratados com Temephos e Temephos-SDS em relação ao controle. Sabe-se que as células caliciformes produzem muco, cuja principal função é a proteção e lubrificação da parede intestinal<sup>16</sup>. De fato, *Oreochromis mossambicus* submetidos à concentração subletal de 0,008 ppm de cipermetrina (piretróide) por 96 h também apresentaram aumento no número de células caliciformes na mucosa intestinal e necrose de enterócitos quando comparado com o grupo controle<sup>25</sup>. O aumento de células caliciformes na mucosa intestinal também tem sido relatado em outros bioensaios toxicológicos tais como a exposição aguda a diferentes concentrações subletais de cloreto de cádmio em *Oreochromis niloticus*<sup>26</sup>. Nesse sentido, secreção exagerada de mucinas foi descrita em todo canal alimentar,

inclusive intestino delgado de *Channa punctatus* exposta a 4 mgL<sup>-1</sup> de glifosato por 45 dias quando comparado ao grupo controle<sup>22</sup>. Em *Corydoras paleatus* verificou um aumento de células caliciformes quatro horas após a administração de organofosforado na água ou na alimentação. Por outro lado, neste mesmo trabalho, verificou-se a diminuição de células caliciformes após 48 h de exposição ao organofosforado<sup>21</sup>. Nesse sentido, o aumento das células caliciformes no intestino delgado nos grupos Temephos e Temephos-SDS pode estar relacionado com a proteção da mucosa intestinal em *D. rerio* contra a ação destes xenobióticos. Por outro lado, a secreção de células caliciformes tem sido agora associada a uma nova via de excreção de xenobióticos tais como nanopartículas de carbono ativadas em intestino de *D. rerio*<sup>27</sup>.

## Conclusão

Os resultados sugerem que as concentrações de Temephos (1 ppm), SDS (2 ppm) e a associação desses dois compostos promovem alterações histológicas, com diminuição da altura e espessura das vilosidades intestinais e altura dos enterócitos e borda estriada, além do aumento do número de células caliciformes nos intestinos de *Danio rerio*. Em relação a associação Temephos-SDS não ficou claro se há um efeito sinérgico, são necessários novos estudos nesse sentido. Além disso, o desenvolvimento de novas formulações torna-se necessário para diminuir os efeitos colaterais em organismos não alvos.

## Agradecimentos

Os autores são gratos a UFSJ/CNPq/FAPEMIG pelas bolsas de iniciação científica e a FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro.

## Declaração de conflitos de interesses

Os autores do artigo afirmam que não houve nenhuma situação de conflito de interesse, tais como propostas de financiamento, emissão de pareceres, promoções ou participação em comitês consultivos ou diretivos, entre outras, que pudessem influenciar no desenvolvimento do trabalho.

## Referências

- JYOTHI, B.; NARAYAN, G. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachius*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 417-421, 1999.
- PEREIRA, B.F.; ALVES, A.L.; SENHORINI, J.A.; ROCHA, R.C.G.A.; SCALIZE, P.H.; PITOL, D.L.; CAETANO, F.H. Effects of biodegradable detergents in morphological parameters of liver in two Neotropical fish



- species (*Prochilodus lineatus* and *Astyanax altiparanae*). **Microscopy Research**, v. 2, n.2, p. 39-49, 2014.
3. CIAMARRO, C. M.; PEREIRA, B. F.; ALVES, R. M. S.; VALIM, J. R. T.; PITOL, D. L.; CAETANO, F. H. Changes in muscle and collagen fibers of fish after exposure to urban pollutants and biodegradable detergents. **Microscopy Research**, v. 3, n. 3, p. 33-40, 2015.
4. INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Vigilância do Câncer Ocupacional e Ambiental**. Disponível em <[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento\\_do\\_inca\\_sobre\\_os\\_agrotoxicos\\_06\\_abr\\_15.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf)>. Acesso em Abr. 2015.
5. YAVARI, S.; MALAKAHMAD, A.; SAPARI, N. B. Biochar efficiency in pesticides sorption as a function of production variables-a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13824-13841, 2015.
6. GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in environment and its bioremediation. **Engineering in Life Science**, v. 5, n. 6, p. 497-526, 2005.
- 7- GUILOSKI, I. C. Atividade da colinesterase em cérebro e músculo de *Corydoras paleatus* (Pisces, Teleostei) expostos ao carbaril. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 461-468, 2010.
- 8 RODRIGUES, H. G.; BATISTA, M. T. A.; FONSECA, L. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Biotemas**, v. 22, n.1, p. 7-16, 2009.
9. LAETZ, C. A.; BALDWIN, D. H.; COLLIER, T. K.; HEBERT, V.; STARK, J. D.; SCHOLZ, N. L. The Synergistic Toxicity of pesticide mixtures: Implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 3, p. 348-353, 2009.
- 10 ABE, F. R. **Avaliação ecotoxicológica e risco ambiental dos inseticidas utilizados no controle da larva de *Aedes aegypti* para *Daphnia magna*, *Lemna minor* e peixes**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2012.
- 11.KUMAR, S.V.; FAREEDULLAHL, MD; SUDHAKARL, Y.; VENKATESWARLUL, B.; KUMAR, E. A. Current review on organophosphorus poisoning. **Archives of Applied Science Research**, v. 2, n.4, 199-215, 2010.
12. VELMURUGAN, B.; SELVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E. I.; UNLU, E. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 286–291, 2007.
13. ASSIS, C. R.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; CARVALHO, E. V. M. M.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO, L. B. J. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**, v. 441, n. 4, p. 141-50, 2012.
14. ROY, D. Toxicity of an anionic detergent, dodecylbenzene sodium sulfonate, to a Freshwater fish, *Rita Rita*: Determination of LC<sub>50</sub> values by different methods. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 15, n.2, p. 186-194, 1998.
15. HONORATO, C. A.; CRUZ, C.; CARNEIRO, D. J.; MACHADO, M. R. F. Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo silagem de peixe. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, n. 4, p. 281-288, 2011.
16. WANG, Z.; DU, J.; LAM, S. H.; MATHAVAM, S.; MATSUDAIRA, P.; ZHIYUAM G. Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. **BMC Genomics**, v. 11, n.2, p. 392-406, 2010.
17. MENKE, A. L.; SPITSBERGEN, J. M.; WOLTERBEEK, A. P. M.; WOUTERSEN, R. A. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 5, p. 759-775, 2011
18. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. In: **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. p. 162, 2009. Disponível: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_nacionais\\_prevencao\\_controle\\_dengue.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf)>. Acesso em: 08 Ago. 2016
- 19 VICENTE, J. **Determinação de surfactantes aniônicos em efluentes de postos revendedores de combustíveis da região da Grande Florianópolis**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – CFM - Departamento de Química. Florianópolis, S.C, 2004.
20. BONH, F.P. **Tratamento do efluente gerado na lavagem de veículos**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Exatas e Engenharias - DCEEng – Curso de Engenharia Mecânica – Campus Panambi, Panambi, R.S. 2014.
21. FANTA, E.; RIOS, F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 54, n.2, p. 119-130, 2003.
22. SENAPATI, T.; MUKERJEE, A. K.; GHOSH, A. R. Observations on the effect of glyphosate based herbicide on ultra structure (SEM) and enzymatic activity in different regions of alimentary canal and gill of *Channa punctatus* (Bloch), **Journal of Crop and Weed**, v. 5, n. 1, p. 236–245, 2009.
23. SASTRY, K. V.; SIDDIQUI, A. A. Effect of the carbamate pesticide sevin on the intestinal absorption of some nutrients in the teleost fish, *Channa punctatus*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 24, n. 3, p. 247-252, 1985.
24. VINATI, H.; RADHA, R. Effect of detergent on histology of fish intestine. **International Journal of Scientific Research and Reviews**, v. 4, n. 1, p-7-15, 2015.
25. KARTHIGAYANI, T.; DENIS, M.; REXLIN, A.; REMY, A.; SHETTU, N. Histological study of the intestine and liver tissues in the fish *Oreochromis mossambicus* exposed to cypermethrin. **Journal of Modern Biotechnology**, v. 3, n. 4, p 48–54, 2014.
26. YOUNIS, E.; ABDEL-WAHAB, A-W.; NASSER, AL-A.; HOSSAM, E. Histopathological alterations in the liver

and intestine of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to long-term sublethal concentrations of cadmium chloride. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 33, n. 4, p. 846-852, 2015.

27. ZHAO, B.; SUN, L.; ZHANG, W.; WANG, Y.; ZHU, J.; ZHU, X.; YANG, L.; CHUNGLI LI, M. M.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y. Secretion of intestinal goblet cells: A novel excretion pathway of nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 4, p 839–849, 2014.