

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS, GENOTÓXICAS, FISIOLÓGICAS E  
HISTOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz 1829)  
EXPOSTO À CIPERMETRINA (GALGOTRIN®)**

**FERNANDA DIAS DE MORAES**

**São Carlos – SP**

**2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS, GENOTÓXICAS, FISIOLÓGICAS E  
HISTOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz 1829)  
EXPOSTO À CIPERMETRINA (GALGOTRIN®)**

**FERNANDA DIAS DE MORAES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**São Carlos – SP**

**2013**

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

M827rb Moraes, Fernanda Dias de.  
Respostas bioquímicas, genotóxicas, fisiológicas e  
histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz  
1829) exposto à cipermetrina (Galgotrin®) / Fernanda Dias  
de Moraes. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
142 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2013.

1. Peixe. 2. Marcadores biológicos. 3. Estresse oxidativo.  
4. Genotoxicidade. 5. Metabolismo. 6. Inseticida piretróide. I.  
Título.

CDD: 597 (20<sup>a</sup>)

Tese de Doutorado de  
**FERNANDA DIAS DE MORAES**

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Gilberto Moraes

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

Prof. Dr. Claudinei da Cruz

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

---

Orientador

Prof. Dr. Gilberto Moraes

Dedico este estudo  
aos meus pais, Samuel e Estela  
ao meu irmão, Rafael  
e ao meu namorado, Danilo.

O amor de vocês me faz melhor.

Muito obrigada.

Obrigada Senhor, por me permitir estudar uma pequena parte da tua  
Criação.



Observai os lírios; eles não fiam, nem tecem.  
Eu, contudo, vos afirmo que nem Salomão,  
em toda a sua glória, se vestiu como qualquer  
deles.

Lucas: 12.27

## Agradecimentos

Ao prof. Gilberto Moraes, meu amigo, professor e orientador, por ensinar tantas coisas na ciência e na vida. Conversar com você é sempre muito bom!

Aos amigos que conheci no trabalho e levarei pela vida: Araceli Hackbarth, Camila Pigão, Cláucia Honorato, Cleujosí Nunes, Fernando Fabrizzi, Francine Venturini, Franmir Brandão, Gustavo Rojas, Ive Avilez, Joyce Visentainel, Juliana Figueiredo, Lícia Lundstedt, Lygia Pereira, Livia Grulli, Lucas Cortella, Luciana Almeida, Natália Shiogiri, Priscila Rossi, Rafael Marques e Rodrigo Camilo.

Ao Sr. Toninho e ao Piau, pela amizade e pelo cuidado com os nossos peixinhos. Sem vocês não tiraríamos o experimento do papel.

À Fran e à Pri, amigas queridas, que gentilmente leram e corrigiram este trabalho.

Aos professores que formaram a banca de avaliação: Prof. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez, Prof. Dra. Marisa Narciso Fernandes, Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida e Prof. Dr. Claudinei da Cruz. Muito obrigada pelas contribuições e correções! Elas enriqueceram este trabalho e a minha formação.

Ao Dr. Claudinei da Cruz, pela amizade e por mediar o fornecimento do Galgotrin®.

À professora Dra. Marisa Narciso Fernandes, que me abriu o seu laboratório, Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa, para as análises de histopatologia.

À Naiara Souza, por me ajudar nas análises histopatológicas.

À professora Dra. Marta Margarete Cestari, que me abriu o seu laboratório, Laboratório de Citogenética Animal, para as análises de genotoxicidade.

À Emanuele Pesenti, por me receber tão bem em Curitiba e me ajudar nas análises de genotoxicidade.

Ao Rafael Marques, por me ajudar com os testes *in vitro* da AChE.

À Piscicultura Polletini, por fornecerem matrinxãs ao nosso laboratório.

Ao Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), por fornecerem matrinxãs ao nosso laboratório.

Às secretárias Greissi, Heloísa e Ivanildes, pela gentileza e eficiência.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, pelo conhecimento transmitido e ideias inculcadas.

Aos amigos e familiares de Pederneiras, pelo incentivo e pelas orações.

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - bolsa de estudo número 143192/2009-4.

# Resumo

---

A cipermetrina é um inseticida piretroide, que atinge o ambiente aquático após aplicações na agricultura, no controle domissanitário, em campanhas de saúde pública e, pela forma direta, na aplicação não regulamentada em pisciculturas. O Galgotrin® é um inseticida comercial cujo princípio ativo é a cipermetrina. A cipermetrina é uma das moléculas com maior representatividade em formulações comerciais no Brasil, segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. A contaminação de ambientes aquáticos por inseticidas piretroides, os efeitos adversos causados por esta ocorrência, a falta de legislação nacional específica para piretroides na água e a importância da criação de matrinxã *Brycon amazonicus* no Brasil, justificam o estudo das respostas bioquímico-fisiológicas de *B. amazonicus* exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin®. O objetivo deste estudo foi investigar biomarcadores bioquímicos, genotóxicos, fisiológicos e histológicos de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin® por 96 horas. Três experimentos foram realizados: I) toxicidade aguda, II) exposição subletal a 20% CL50;96h por 96 horas e III) exposição subletal a 20, 40 e 60% da CL50;96 por 96 horas. No experimento I, foi estimada a concentração letal de cipermetrina, na formulação Galgotrin®, para 50% da população de *B. amazonicus*. No experimento II, o metabolismo antioxidante enzimático e não enzimático, a peroxidação lipídica, o balanço iônico, as variáveis hematológicas, a histopatologia de brânquias e a neurotoxicidade foram acessadas em diferentes tecidos de *B. amazonicus* exposto a 20% da CL50;96h. No experimento III, a genotoxicidade foi acessada pelo teste do cometa em células vermelhas e hepatócitos de *B. amazonicus* exposto a 20, 40 e 60% da CL50;96h. Os resultados do experimento I indicaram o Galgotrin® é extremamente tóxica ao *B. amazonicus* (CL50;96h foi de 36 µg L<sup>-1</sup>). Os resultados do experimento II indicaram que houve estresse oxidativo em fígado e brânquias de *B. amazonicus*, tendo em vista o aumento de LPO nestes tecidos. Além disso, observou-se aumento de sódio e cloreto plasmáticos e da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase branquial. No sangue, constatou-se aumento de células vermelhas, de hemoglobina total e do hematócrito. Nas brânquias, verificou-se aumento do índice de alterações histopatológicas, tais como hiperplasia e hipertrofia de células cloreto, aneurismas, dilatação dos vasos sanguíneos e hemorragias com ruptura do epitélio. As alterações osmorregulatórias, hematológicas e histológicas estão intimamente relacionadas. Basicamente, estes ajustes ocorreram para

aumentar a captação de oxigênio e de íons pelo organismo. No entanto, algumas patologias, evidenciadas pelos aneurismas e hemorragias, devem-se aos danos que o inseticida provocou nas brânquias, tendo em vista a natureza lipofílica da molécula. *In vitro*, o Galgotrin® foi neurotóxico ao *B. amazonicus*, pois se observou redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral em até 65%. *In vivo*, observou aumento da atividade da AChE muscular. Os resultados do experimento III indicaram que a cipermetrina, na formulação Galgotrin®, é genotóxica às células vermelhas e aos hepatócitos. Nestes tecidos, observou-se danos ao DNA, evidenciados pelo teste do cometa, sendo que nas células vermelhas os danos foram concentração-dependentes. A genotoxicidade do Galgotrin® pode estar relacionada ao efeito direto do inseticida no DNA e/ou ao estresse oxidativo.

Palavras-chaves: Biomarcadores. Estresse oxidativo. Genotoxicidade. Metabolismo. Toxicidade. Peixe. Piretroide.

# Abstract

---

Cypermethrin is a pyrethroid insecticide that reaches aquatic environments over the control of pests in crops and house insects, in urban control of vectors, or directly in fish farms. Galgotrin<sup>®</sup> is a cypermethrin commercial formulation, namely in this study as cypermethrin-based insecticide (CBI). According to the “Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento”, cypermethrin is the most traded insecticide in Brazil. The environmental aquatic contamination by pyrethroids, the adverse effects of such contamination, the lack of national rules to define pyrethroids concentration in water and the commercial importance of matrinxá *Brycon amazonicus* in Brazil, the study of biochemical and physiological responses of this species exposed to CBI (Galgotrin<sup>®</sup>) is justified. The goal of this study was to investigate the biochemical, genotoxic, physiological and histopathological biomarkers in *B. amazonicus* exposed to CBI Galgotrin<sup>®</sup> for 96 hours. Three experiments were conducted: I) acute toxicity, II) sublethal exposure to 20% LC50;96h of CBI for 96 hours and III) sublethal exposure to 20, 40 and 60% LC50;96h of CBI for 96 hours. On the experiment I, the lethal concentration of CBI (Galgotrin<sup>®</sup>) to 50% of *B. amazonicus* population was estimated. On the experiment II, the antioxidant metabolism, the lipid peroxidation (LPO), the ionic balance, the hematological profile, the histopathology of gills, and the neurotoxicity were accessed in *B. amazonicus* exposed to 20% of LC50;96h. On the experiment III, the genotoxicity was accessed by the comet assay in red blood cells and hepatocytes of *B. amazonicus* exposed to 20, 40 and 60% of LC50;96h. Results of the experiment I indicated that LC50;96h of CBI was 36 µg L<sup>-1</sup>, extremely toxic to *B. amazonicus*. Results of the experiment II indicated that the antioxidant metabolism was not enough to counteract the radical oxygen species (ROS) and an oxidative stress occurred in liver and gills of *B. amazonicus*. Consequently, LPO was observed in these tissues. The plasma sodium and chloride concentrations and the gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity were increased. The red blood cell count (RBCC), the total hemoglobin concentration (total Hb) and the hematocrit (Ht) were increased in the exposed fish. In the gills, the index of histopathological alterations was raised in exposed fish, and some alterations were observed such as hyperplasia, hypertrophy of chloride cell (CC), aneurisms and hemorrhage. The osmoregulatory, hematological and histopathological disorders seemed connected; these adjustments occurred to increase the oxygen and ion uptake. However, some morphological alterations in the gills were due to damages resulted from direct effect of CBI,

which is lipophilic. *In vitro*, CBI was neurotoxic to *B. amazonicus*; the brain acetylcholinesterase (AChE) activity was decreased up to 65%. *In vivo*, muscle AChE activity was increased. The results from the experiment III indicated that CBI was genotoxic to red blood cells and hepatocytes of *B. amazonicus*. The damages on DNA were observed through the comet assay, and the red blood cell presented damages to DNA in a concentration-dependent way. The genotoxicity of CBI (Galgotrin®) could be related to direct effect of the insecticide to DNA and/or to oxidative stress.

Key words: Biomarkers. Oxidative stress. Genotoxicity. Metabolism. Toxicity. Fish. Pyrethroid.

# Lista de abreviaturas e siglas

---

•NO – óxido nítrico

•NO<sub>2</sub> - dióxido de nitrogênio

•OH – radical hidroxila

ACh - acetilcolina

AChE - acetilcolinesterase

Ca<sup>2+</sup>-ATPase –cálcio ATPase

CAT – catalase

CBI – cypermethrin based-insecticide

CC – células cloreto

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

CL50– concentração letal para 50% da população

CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> - carbonato

dGuo - desoxiguanosina

DNA – ácido desoxiribonucleico

dR- 2-deoxiribose

e<sup>-</sup> - elétron

ER – species reativas

ERN – species reativas de nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FAOOH – hidroperóxidos de ácidos graxos

FOX - Ferrous Oxidation/ Xylenol

G6PDH – glucose-6-fosfato desidrogenase

GPx – glutathiona peroxidase

GR – glutathiona reductase

GSH – glutathiona

GSSG – glutathiona dissulfeto

H• - hidrogênio alílico

H<sup>+</sup>- ATPase – próton ATPase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

Hb total – hemoglobina total

HCM- hemoglobina corpuscular média

HO<sub>2</sub>• - ácido peroxil

HOCl – ácido hipocloro

Ht - hematócrito

L• - radical alquila

LOO• - radical peroxila

LOOH – hidroperóxidos de lipídios

LPO – Lipid Peroxidation – peroxidação lipídica

M<sub>1</sub>gGuo - aduto pirimidopurinoma

MAPA – ministério da agricultura pecuária e abastecimento

MDA - malonaldeído

MetaHb - metahemoglobina

Mg<sup>++</sup>-ATPase – magnésio ATPase

MN – micronúcleos

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase – sódio potássio ATPase

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ânions superóxido

OONO<sup>-</sup> - peroxinitrito

OP – organofosforado

PV – células pavimentosas

RBCC – Red Blood Cell Count

RO<sup>•</sup> - alcoxil

RO<sub>2</sub><sup>•</sup> - peroxil

ROS – Reactive Oxygen Species

SCG - *Single Cell Gel Assay*

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

VCM – volume corpuscular médio

# Lista de Figuras

---

**Figura 1** - Fórmula estrutural da piretrina I, um inseticida natural extraído do crisântemo. A molécula é dividida em duas partes: a porção ácida e a porção álcool. .... 26

**Figura 2** - Persistência (em porcentagem) dos piretroides  $\lambda$ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água por 80 dias. .... 28

**Figura 3** - Os piretroides atingem o ambiente aquático por dois caminhos: **A)** pela aplicação direta em sistemas intensivos de criação de peixes, e **B)** pela aplicação indireta em áreas agrícolas e em campanhas de saúde pública, que pode carregá-los para os corpos d'água, por liviação e escoamento. .... 29

**Figura 4** - Representação gráfica do mecanismo de ação de piretroides nos canais de sódio voltagem-dependentes em células nervosas. **A)** No estado de repouso, o canal fica fechado ao ambiente extracelular. Em resposta ao estímulo, o canal se abre para permitir a entrada de sódio ( $\text{Na}^+$ ) na célula. Quando o estímulo cessa, o canal fecha as suas comportas intra e extracelulares para prevenir a entrada de  $\text{Na}^+$ ; então, a célula volta ao estado de repouso. **B)** Os piretroides podem afetar os canais de sódio voltagem-dependentes de duas formas. Os piretroides do tipo I prolongam a abertura dos canais de sódio na despolarização, gerando repetidos potenciais de ação. Os piretroides do tipo II retardam o fechamento do canal para o estado inativado. **C)** Comparação dos potenciais de ação dos canais de sódio voltagem-dependentes entre um potencial de ação normal, de exposição ao piretroide do tipo I e do tipo II. Enquanto os piretroides do tipo I promovem repetidos potenciais de ação, os piretroides do tipo II apresentam uma redução gradual na amplitude do potencial de ação, embora nunca retorne ao estado de repouso. .... 30

**Figura 5** - A via metabólica para a desintoxicação da cipermetrina dá-se via a hidroxilação-4' em peixes e vertebrados superiores, pela citocromo P450 (1). A reação de hidrólise por carboxilesterases (2) ocorre rapidamente em aves e mamíferos mas não em peixes. Esta deficiência contribui para o aumento da toxicidade de piretroides em peixes. .... 31

**Figura 6** - Fórmula estrutural da cipermetrina. O carbono 1, 3 e o  $\alpha$ -benzil (\*) são os três centros quirais da molécula. .... 33

**Figura 7** - Quantidade de produtos comerciais registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, cujos ingredientes ativos são piretroides. .... 34

**Figura 8** - Relação de tempo de resposta, sensibilidade e relevância ecológica de respostas típicas em condições de estresse associadas com os níveis de organização biológica. .... 36

**Figura 9** - Na mitocôndria, a cadeia transportadora de elétrons gera ERO naturalmente durante a redução do  $O_2$ . As setas vermelhas indicam as ERO formadas, sendo que o primeiro é o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o segundo é a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o terceiro é o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ). ..... 39

**Figura 10** - Reação proposta por Haber e Weiss, na qual o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pode reagir com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e formar o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) (em azul), que é o mais reativo e tóxico às biomoléculas. Esta reação pode ser catalisada por metais de transição, sendo assim chamada de reação de Fenton. .... 39

**Figura 11** - Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo ciclo redox, no retículo endoplasmático. A redução do xenobiótico (composto primário) pela NADPH-citocromo P450 redutase gera um metabólito radical. O metabólito radical pode transferir um elétron para o  $O_2$  produzindo o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), indicado pela seta vermelha. O composto primário é regenerado a um alto custo de energia para a célula. A partir do  $O_2^{\bullet-}$  outras ERO podem surgir, como o hidroperóxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ). ..... 41

**Figura 12** - Antioxidantes não enzimáticos. **A)** O ascorbato é um potente agente redutor, inclusive contra as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo por isso chamado de antioxidante. **B)** A glutathiona (GSH) participa da reação acoplada catalisada pela glutathiona peroxidase (GPx) e pode agir diretamente nas ERO ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ), com o seu grupo tiol ( $-SH$ ) (texto adaptado de Di Giulio e Meyer, 2008). As setas indicam os locais da molécula antioxidante capazes de sofrer oxidação, com doação de elétrons para os oxidantes. .... 43

**Figura 13** - Antioxidantes enzimáticos. **A)** A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), aceitando um elétron de outro  $O_2^{\bullet-}$ . **B)** A catalase (CAT) elimina os  $H_2O_2$  dentro e fora dos peroxissomos. **C)** A glutathiona peroxidase (GPx) é outro mecanismo que a célula dispõe para eliminar o  $H_2O_2$ . Além disso, esta enzima pode reduzir hidroperóxidos de lipídios (LOOH), desde que eles não estejam esterificados à membrana. A glutathiona (GSH) é utilizada em ambas as reduções como co-substrato desta enzima (Texto adaptado de Di Giulio e Meyer, 2008). ..... 44

**Figura 14** - A peroxidação lipídica é uma reação em cascata dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação. A iniciação ocorre quando os ácidos graxos poliinsaturados (LH) têm seus hidrogênios alílicos ( $H^{\bullet}$ ) sequestrados por espécies reativas, gerando assim um radical alquila ( $L^{\bullet}$ ). Na presença de oxigênio, o  $L^{\bullet}$  origina o radical peroxila ( $LOO^{\bullet}$ ). O  $LOO^{\bullet}$  pode sequestrar outro  $H^{\bullet}$  de outros ácidos graxos poliinsaturados, dando assim origem ao hidroperóxido de lipídio (LOOH) e iniciando a propagação da reação. A fase de terminação ocorre com a reação entre os radicais de lipídio formando produtos não radicalares. A seta indica o produto primário da peroxidação lipídica que pode ser quantificado pelo método FOX (Ferrous Oxidation/ Xylenol). ..... 46

- Figura 15** - Peroxidação lipídica (LPO). **A)** iniciação do processo de LPO por um radical livre e sequestro de um hidrogênio alílico, seguido da oxigenação do radical. **B)** formação do radical peroxila. **C)** hidroperóxido de lipídio..... 47
- Figura 16** - **A)** Nucleóides de hepatócitos de *Danio rerio* (controle). **B)** Nucleóides (ou “cometas”) de hepatócitos de *D. rerio* exposto *in vitro* à cipermetrina por 2 horas. Lâminas coradas com laranja de acridina e analisadas em microscópio de fluorescência. .... 51
- Figura 17** - **A)** Reação de oxidação da desoxiguanosina (dGuo) com o radical hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), formando a 8-oxodGuo. **B)** Reação do malonaldeído (MDA), produto da LPO, com a desoxiguanosina (dGuo), formando o aduto pirimidopurinoma ( $\text{M}_1\text{gGuo}$ ). dR= 2-deoxiribose. .... 52
- Figura 18** - Representação gráfica dos mecanismos osmorregulatórios do epitélio branquial de teleosteo de água doce. CC = célula cloreto; CP = célula pavimentosa; ~ indica ATPase. Transporte ativo e co-transporte são indicados por linhas sólidas; transporte passivo por linhas pontilhadas. .... 55
- Figura 19** - Alterações histopatológicas resultante das alterações bioquímicas e fisiológicas. .... 57
- Figura 20** - Diagrama esquemático das lesões branquiais mais comuns. (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; cc = célula-cloreto; mu = célula mucosa; pi = célula pilar; ce = célula epitelial lamelar; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sangüíneo marginal. .... 59
- Figura 21** - Matrinxã *Brycon amazonicus* (SPIX; AGASSIZ 1829)..... 60
- Figura 22** - Concentrações nominais ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) do ingrediente ativo cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, para o teste de toxicidade aguda (CL50) por 96 horas,  $n= 9$  para cada condição experimental C = controle, sem inseticida..... 68
- Figura 23** - Representação gráfica do segundo experimento da exposição subletal ao Galgotrin<sup>®</sup>,  $n=15$  para cada condição experimental ( $n=5$  por caixa). C = controle, sem inseticida; concentração nominal de cipermetrina em  $\mu\text{g L}^{-1}$  ..... 70
- Figura 24** - Representação gráfica do terceiro experimento da exposição subletal ao Galgotrin<sup>®</sup>,  $n=15$  por condição experimental ( $n=7$  ou 8 por caixa). C = controle, sem inseticida; concentrações nominais de cipermetrina em  $\mu\text{g L}^{-1}$ . .... 82
- Figura 25** - Cometas de células vermelhas de *Brycon amazonicus* exposto a cipermetrina (Galgotrin) observados com aumento de 400 $\times$  em microscópio de epifluorescência e corados com brometo de etídeo. Classe 0 (sem dano aparente); classe 1 (dano pequeno); classe 2 (dano médio); classe 3 (dano extenso) e classe 4 (dano máximo). .... 85

**Figura 26** - Peroxidação lipídica de fígado e brânquias de *Brycon amazonicus* exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ). ..... 89

**Figura 27** - Atividade das enzimas hepáticas catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e superóxido dismutase (SOD) de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). A enzima G6PDH está representada em UI  $10^2 \text{ mg proteína}^{-1}$ . Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ). ..... 90

**Figura 28** - Atividade das enzimas branquiais catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ). ..... 91

**Figura 29** - Atividade das enzimas renais catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PDH) de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ). ..... 92

**Figura 30** - Concentração de glutaciona (GSH) em fígado e brânquias de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ . (\*\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,001$ ); (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ). ..... 93

**Figura 31** - Concentração de ácido ascórbico em fígado, brânquias, cérebro e rim de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ). ..... 93

**Figura 32** – Fotomicrografias de brânquias de *Brycon amazonicus* expostos a  $7,2\mu\text{g/L}$  de cipermetrina (Galgotrin<sup>®</sup>) **A.** Estrutura branquial normal; **B.** Hipertrofia do epitélio da lamela; **C.** (\*) Indica hiperplasia do epitélio do filamento; **D.** (\*) Indica hiperplasia do epitélio da lamela e seta preta indica fusão; **E.** Descolamento do epitélio lamelar; **F.** Hiperplasia e hipertrofia de Células Mucosas – seta vermelha indica célula mucosa vazia. Abreviações: CMar = canal marginal; CPV = células pavimentosas; E = eritrócito; CPi = células pilares; CC = célula cloreto. **L.** Lamela; **F.** Filamento. Escala =  $20 \mu\text{m}$ . ..... 95

**Figura 33** - Fotomicrografias de brânquias de *Brycon amazonicus* exposto a  $7,2\mu\text{g/L}$  de Cipermetrina. **A.** Hiperplasia e hipertrofia de células cloreto; **B.** Dilatação de vasos sanguíneos; **C.** Aneurisma apical; **D.** Aneurisma. Escala =  $20 \mu\text{m}$ . Coloração = Azul de Toluidina. ..... 96

**Figura 34** - Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias de *B. amazonicus* exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão para  $n=4$ . \* indica diferença significativa ( $P<0,05$ )...... 98

**Figura 35** - Concentrações dos íons (mEq/mL), de proteína (mg/mL) e de glicose ( $\mu\text{mol/mL}$ ) plasmáticos em matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. Os valores são expressos como média ± desvio padrão para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ )...... 99

**Figura 36** - Atividade da enzima branquial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina (Galgotrin<sup>®</sup>), após 96h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ )...... 99

**Figura 37** - Variáveis hematológicas de *B. amazonicus* exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>. Ht (microhematócrito) está expresso em %; Hb (hemoglobina total) em  $\text{g dL}^{-1}$ ; RBCC (número de células vermelhas) em  $10^6$  de células  $\text{mm}^{-3}$ . Os valores são apresentados como média ± desvio padrão para  $n=15$ . (\*) indica diferença significativa entre grupo exposto e controle ( $P<0,05$ )...... 100

**Figura 38** - Índices hematimétricos e concentração de metahemoglobina (MetaHb) de *B. amazonicus* exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>. VCM (volume corpuscular médio) está expresso em  $\mu\text{m}^3$ ; HCM (hemoglobina corpuscular média) em  $\text{pg célula}^{-1}$ ; CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) em  $\text{g dL}^{-1}$ ; MetaHb em %. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão para  $n=15$ ...... 101

**Figura 39** - Atividade da enzima acetilcolinesterase de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ )...... 102

**Figura 40** - Ensaio *in vitro* da atividade da AChE cerebral de matrinxã na presença de diferentes concentrações de cipermetrina Galgotrin<sup>®</sup>. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Os pontos indicam a média da atividade enzimática ( $n=3$ ) e a linha indica regressão linear. .... 103

**Figura 41** - Atividade, em porcentagem, do ensaio *in vitro* acetilcolinesterase cerebral de matrinxã na presença de diferentes concentrações de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>. Os pontos indicam da média atividade enzimática em porcentagem ( $n=3$ ) e a linha indica a regressão linear. .... 103

**Figura 42** - Escores de danos ao DNA, acessados pelo teste do cometa, de células vermelhas de *Brycon amazonicus* exposto a 20% da CL50;96 h ( $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), a 40% ( $14,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e a 60% ( $21,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Linha cheia indica a

mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P<0,05$ ). ..... 105

**Figura 43** - Escores de danos ao DNA, acessados pelo teste do cometa, de células hepáticas de *Brycon amazonicus* exposto a 20% da CL50;96 h ( $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), a 40% ( $14,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e a 60% ( $21,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P<0,05$ ). ..... 106

**Figura 44** - Representação gráfica da compensação do sistema antioxidante de brânquias e fígado de *B. amazonicus* exposto a  $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$  de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>. Apesar de o sistema antioxidante responder à condição adversa, houve um aumento de hidroperóxidos de lipídeos, que caracterizou o estresse oxidativo nos mesmos. ERO = espécies reativas de oxigênio; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; G6PDH = glicose 6-fosfato desidrogenase; GSH = glutathiona;  $X^{\bullet}$  = radical livre. .... 112

**Figura 45** - Representação gráfica dos ajustes osmorregulatórios e hematológicos de *B. amazonicus* exposto à cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>. O retângulo vermelho representa uma lamela branquial. As setas representam as trocas gasosas. CC = célula cloreto. A condição estressora pode provocar a proliferação de CC e, conseqüentemente, o aumento da reabsorção de íons, bem como da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. O aumento da atividade de  $\text{H}^+$ -ATPases em células pavimentosas pode resultar em aumento do fluxo de  $\text{Na}^+$ . Como as trocas gasosas ficam prejudicadas com o aumento da barreira lamelar, alguns ajustes hematológicos foram ativados, como o aumento de células vermelhas e da concentração de hemoglobina, a fim de evitar hipóxia. .... 119

**Figura 46** - Representação gráfica do mecanismo proposto para a inibição *in vitro* da AChE cerebral e o aumento *in vivo* da atividade da AChE muscular de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin<sup>®</sup>. +++ indica hiperexcitabilidade da transmissão nervosa no motoneurônio. .... 122

# Lista de Tabelas

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1.</b> Qualidade da água do experimento I: teste de toxicidade aguda.....   | 69  |
| <b>Tabela 2.</b> Qualidade da água no experimento II: exposição subletal a 7,2 µg L <sup>-1</sup> (20 % da CL50;96h) de cipermetrina, na formulação Galgotrin <sup>®</sup> , por 96 horas. ....   | 71  |
| <b>Tabela 3.</b> Classificação da severidade das alterações do órgão conforme o Índice de Alterações Histopatológicas (IAH). ....   | 80  |
| <b>Tabela 4.</b> Classificação das alterações histopatológicas de brânquias em estágios de comprometimento da função do órgão.....  | 81  |
| <b>Tabela 5.</b> Qualidade da água no experimento III: exposição subletal a 7,2 µg L <sup>-1</sup> (20 % da CL50;96h), 14,4 µg L <sup>-1</sup> (40% da CL50;96h) e 21,6 µg L <sup>-1</sup> (60% da CL50;96h) de cipermetrina, na formulação Galgotrin <sup>®</sup> , por 96 horas. .... | 83  |
| <b>Tabela 6.</b> Mortalidade de matrinxã <i>B. amazonicus</i> submetido ao teste de toxicidade aguda (CL50;96h) para a cipermetrina, na formulação Galgotrin <sup>®</sup> .....   | 88  |
| <b>Tabela 7.</b> Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de <i>Brycon amazonicus</i> expostos a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin <sup>®</sup> , por 96 horas. ....  | 97  |
| <b>Tabela 8.</b> Toxicidade aguda para espécies de peixes expostas à cipermetrina por 96 horas.   | 109 |

# Sumário

---

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introdução</b> .....   | 20 |
| <b>2. Revisão de Literatura</b> .....  | 24 |
| 2.1. Agrotóxicos no Brasil .....   | 25 |
| 2.2. Piretroides e piretrinas .....  | 26 |
| 2.3. Os piretroides no ambiente aquático e seus mecanismos de ação .....                               | 28 |
| 2.4. Cipermetrina e toxicidade em peixes .....   | 32 |
| 2.5. Biomarcadores .....   | 35 |
| 2.5.1. Biomarcadores bioquímicos e piretroides .....   | 37 |
| 2.5.2. Biomarcadores fisiológicos e piretroides .....  | 53 |
| 2.5.3. Biomarcadores patológicos e piretroides .....   | 57 |
| 2.6. A espécie de estudo .....   | 60 |
| <b>3. Justificativa e Objetivo</b> .....   | 62 |
| <b>4. Material e Métodos</b> .....   | 65 |
| 4.1 Comitê de ética .....  | 66 |
| 4.2 Reagentes e inseticida .....   | 66 |
| 4.3 Qualidade da água .....  | 67 |
| 4.4 Aclimação dos animais .....  | 67 |
| 4.5 EXPERIMENTO I: Teste de toxicidade aguda (CL50;96h) e sinais de intoxicação .....                  | 68 |
| 4.6 EXPERIMENTO II: Exposição subletal ao Galgotrin® por 96 horas .....                                | 69 |
| 4.6.1 Balanço redox .....  | 71 |
| 4.6.2 Balanço iônico e variáveis hematológicas .....   | 75 |
| 4.6.3 Neurotoxicidade .....  | 77 |
| 4.6.4 Histopatologia de brânquias .....  | 79 |
| 4.7 EXPERIMENTO III: Exposição subletal ao Galgotrin® por 96 horas – Avaliação da genotoxicidade ..... | 82 |
| 4.7.1 Ensaio cometa com eritrócitos .....  | 83 |
| 4.7.2 Ensaio cometa com células do tecido hepático .....   | 85 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>5 Resultados</b> .....   | 87  |
| 5.1 EXPERIMENTO I: Teste de toxicidade aguda (CL50;96h) e sinais de intoxicação                                   | 88  |
| 5.2 EXPERIMENTO II: Exposição subletal ao Galgotrin <sup>®</sup> por 96 horas .....                               | 89  |
| 5.2.1 Balanço redox.....  | 89  |
| 5.2.2 Histopatologias de brânquias .....  | 94  |
| 5.2.3 Balanço iônico e variáveis hematológicas .....  | 98  |
| 5.2.4 Neurotoxicidade .....   | 101 |
| 5.3 EXPERIMENTO III: Exposição subletal ao Galgotrin <sup>®</sup> por 96 horas – Avaliação da genotoxicidade..... | 104 |
| <b>6 Discussão</b> .....  | 107 |
| 6.1 EXPERIMENTO I: Teste de toxicidade aguda (CL50;96h) e sinais de intoxicação                                   | 108 |
| 6.2 EXPERIMENTO II: Exposição subletal ao Galgotrin <sup>®</sup> por 96 horas .....                               | 110 |
| 6.2.1 Balanço redox.....  | 110 |
| 6.2.2 Histopatologias de brânquias .....  | 115 |
| 6.2.3 Balanço iônico e variáveis hematológicas .....  | 117 |
| 6.2.4 Neurotoxicidade .....   | 120 |
| 6.3 EXPERIMENTO III: Exposição subletal ao Galgotrin <sup>®</sup> por 96 horas – Avaliação da genotoxicidade..... | 123 |
| <b>7 Conclusões</b> .....   | 125 |
| <b>Referências</b> .....  | 127 |

# 1. Introdução

---

A crescente utilização de agrotóxicos na aquicultura, na produção animal e agrícola e no combate a insetos domésticos expõe os organismos aquáticos a uma série de contaminantes ambientais. Embora os prejuízos desta exposição nem sempre sejam agudos ou perceptíveis, os danos ambientais podem se estender em longo prazo até tornarem-se irreversíveis.

O estudo das respostas iniciais de animais expostos a contaminantes ambientais pode ajudar a compreender e prevenir os efeitos nocivos que poderiam ocorrer em alto nível de organização biológica (OOST et al., 2003). Estas respostas são chamadas de biomarcadores e podem ser avaliadas em organismos não alvos, fornecendo assim subsídios para a regulamentação do uso de produtos químicos em ambientes aquáticos.

Um dos contaminantes ambientais em evidência nos últimos anos é a classe de inseticidas piretroides. A utilização de inseticidas piretroides está em ascensão no mundo todo, pois esta classe de inseticidas é potente, de rápida ação e toxicidade relativamente baixa para os mamíferos (ELLIOTT, 1976; SODERLUND et al., 2002). Os inseticidas piretroides são regulamentados para o combate de ectoparasitos em peixes em alguns países, como Noruega, Irlanda e Escócia (HART et al., 1997; SEPA, 1998; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2003; HAYA, 2005). Por isso, os piretroides podem atingir o ambiente e os organismos aquáticos através da aplicação direta. Somado a isto, tem-se a aplicação indireta de piretroides no ambiente aquático, que se dá por meio de áreas agrícolas e em campanhas de saúde pública, carreando assim, o inseticida aos corpos d'água por lixiviação e escoamento.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na resolução 357/2005 (BRASIL, 2005a), não determina o limites de piretroides em água doce. O Ministério da Saúde estabeleceu a concentração máxima de permetrina na água potável em  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (BRASIL, 2005b). No entanto, a utilização dos piretroides no país não está restrita à permetrina. Outros piretroides estão sendo amplamente utilizados e registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Marino e Ronco (2005) e Belluta et al. (2010) relatam concentrações de cipermetrina no ambiente aquático, as quais podem atingir até  $194$  e  $111 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

A cipermetrina é um inseticida piretroide utilizado na produção agrícola, no controle de vetores, no combate a insetos domésticos (baratas, moscas, pernilongos e mosquitos) e no controle de ectoparasitos em animais, incluindo os peixes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007, EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2003; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008, HART et al., 1997). No

Brasil, a cipermetrina é um dos princípios ativos piretroides com maior número de registros em produtos comerciais (BRASIL, 2013). Embora os piretroides não sejam muito tóxicos para aves e mamíferos, eles são altamente tóxicos para os peixes (COATS, 2008, JONES, 1995; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008), mesmo em baixas concentrações.

Os piretroides podem provocar efeitos danosos e subletais em peixes, como alterações hematológicas (ADHIKARI et al., 2004; PIMPÃO et al., 2007; AL-GHANBOUSI et al., 2012); nos padrões de comportamento (JAENSSON et al., 2007; BORGES et al., 2007); no desenvolvimento embrionário (MONTANHA et al., 2012); genotoxicidade (ANSARI et al., 2011; JIN et al., 2011); estresse oxidativo (ANSARI et al., 2011; JIN et al., 2011; CORTELLA, 2010); e hepatotoxicidade (CORTELLA, 2010).

Os mecanismos da toxicidade dos piretroides em peixes ainda estão sendo estudados, mas sabe-se que a sensibilidade do sistema nervoso e os mecanismos de metabolização de piretroides são pontos-chave desta questão (COATS, 2008). A enzima acetilcolinesterase (AChE), presente nas células nervosa e na placa motora, pode indicar se o sistema nervoso do animal é susceptível a contaminação ambiental. Esta enzima é responsiva a uma série de inseticidas, inclusive aos piretroides (MUSHIGERI; DAVID, 2005; KUMAR et al., 2009).

Os peixes retêm os piretroides por mais tempo no organismo e parecem ser deficientes em carboxilesterases que hidrolisam piretroides (DEMOUTE, 1989; BRADBURY; COATS, 1989; HAYA, 1989). Dessa forma, durante o processo de desintoxicação de piretroides, muitas espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser geradas no organismo. É bem documentado que o desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes, com prevalência dos oxidantes, ocasiona o estresse oxidativo (GUTTERIDGE, 1995; KELLY et al., 1998). O aumento das ERO pode ser tóxico às biomoléculas, incluindo os lipídios, que quando oxidados pelas ERO dão origem aos hidroperóxidos (JEZEK; HLAVATÁ, 2005). Os hidroperóxidos de lipídios podem desestabilizar as organelas, promover o extravasamento de enzimas lisossomais no citosol, aumentar a permeabilidade da membrana celular, diminuir a sua fluidez e inibir enzimas ligadas a ela (DI GIULIO; MEYER, 2008). O DNA é outro componente celular sensível às ERO (LESSER, 2012). As ERO podem causar muitos danos ao DNA, como oxidação de bases nitrogenadas, quebra de fita simples e dupla, e ligações cruzadas do DNA com proteínas. As alterações nucleares decorrentes da exposição à xenobióticos podem ser evidenciadas por muitas técnicas, como a avaliação de micronúcleos e pelo teste do cometa. O teste do cometa é sensível, amplamente utilizado em organismos

aquáticos e permite detectar danos até mesmo em baixas concentrações de xenobióticos (JHA, 2008; FRENZILLI et al., 2009), inclusive com piretroides (KAN et al., 2012).

Além disso, os piretroides podem afetar as características hematológicas, a concentração de íons plasmáticos, os canais de cálcio, as enzimas cálcio/magnésio ATPases e as  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases (COATS, 2008; SUVETHA et al., 2010). Como estas enzimas estão envolvidas na osmorregulação em peixes, esta função parece ser outro alvo da toxicidade dos piretroides (COATS, 2008).

Somado às ferramentas bioquímico-fisiológicas, tem-se os biomarcadores histopatológicos, que são responsivos à contaminação por piretroides (KAN et al., 2012). As alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nos tecidos e nos órgãos. A histopatologia pode complementar os resultados referentes às respostas bioquímicas em peixes expostos aos estressores ambientais, principalmente em concentrações subletais (SCHWAIGER, 1997; BERNET et al., 1999).

Dessa forma, a contaminação de ambientes aquáticos por inseticidas piretroides, os efeitos adversos causados por esta ocorrência, a falta de legislação nacional específica para piretroides na água e a importância da criação de matrinxã *Brycon amazonicus* no Brasil, justificam o estudo das respostas bioquímico-fisiológicas e histopatológicas de *B. amazonicus* exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>. O objetivo deste estudo foi investigar biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e patológicos de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin<sup>®</sup> por 96 horas, em duas condições experimentais: exposição aguda e subletal. Estas informações contribuirão para o melhor entendimento da toxicidade dos piretroides em peixes e poderão subsidiar programas de monitoramento ambiental.

## **2. Revisão de Literatura**

---

## 2.1. Agrotóxicos no Brasil

O aumento da produção de alimento de forma sustentável é um desafio do setor agrícola e os agrotóxicos estão entre os principais instrumentos para o desenvolvimento da agricultura brasileira (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004).

Entendem-se agrotóxicos como os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso no setor da produção, nas pastagens, na proteção de florestas e de outros ecossistemas, na proteção de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a flora e fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989). Conforme a ação biológica do agrotóxico pode-se classificá-lo em acaricida, herbicida, fungicida, moluscida, rodenticida, reguladores de crescimento e inseticidas. No Brasil, os agrotóxicos mais utilizados são os herbicidas, os acaricidas, os fungicidas e os inseticidas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo que o Estado de São Paulo é o principal consumidor, com consumo estimado em 54 916 toneladas de ingrediente ativo por ano, representando 26% do total do consumo brasileiro (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010). Quanto ao consumo de inseticidas, verifica-se que o Estado de São Paulo é o segundo maior consumidor no Brasil, com 7 574 toneladas de ingrediente ativo ao ano, ficando atrás apenas de Mato Grosso, com 10 076 toneladas de ingrediente ativo ao ano (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

Os agrotóxicos podem ser persistentes, móveis ou tóxicos no solo, na água e no ar. Podem ainda acumular-se no solo e na biota, e seus resíduos podem atingir as águas superficiais por escoamento e as subterrâneas por lixiviação. Dessa forma, o uso intensivo de agrotóxicos está associado a prejuízos à população, tanto aos consumidores dos alimentos, como aos trabalhadores que lidam diretamente com os produtos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004).

Os agrotóxicos são classificados em I, II, III e IV, de acordo com a sua toxicidade (DL – dose letal) em mamíferos. Os agrotóxicos do grupo I são considerados extremamente tóxicos; os agrotóxicos do grupo II são altamente tóxicos; os do grupo III são medianamente tóxicos e os agrotóxicos do grupo IV são considerados pouco tóxicos. Visando o

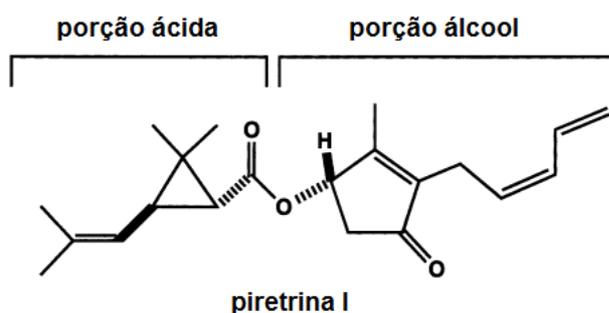
desenvolvimento sustentável, nos últimos anos, verificou-se a redução do consumo de agrotóxicos pertencentes às classes toxicológicas I e II e aumento do consumo de agrotóxicos das classes III e IV (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008). Dessa forma, visando à substituição dos inseticidas persistentes no ambiente e de alta toxicidade, novas moléculas de rápida degradação e baixa toxicidade para mamíferos têm sido elaboradas, tais como os neonicotinoides e os piretroides.

Os piretroides são considerados uma alternativa aos organoclorados, que são muito persistentes no ambiente, e aos organofosforados e carbamatos, que são muito tóxicos, principalmente ao sistema nervoso central (SANTOS et al., 2007).

## 2.2. Piretroides e piretrinas

Os piretroides são um grupo de inseticidas sintéticos derivados estruturalmente das piretrinas, que podem ser extraídas da planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*. As flores desta planta apresentam seis tipos de compostos com propriedades inseticidas, denominadas piretrina I, piretrina II, cinerina I, cinerina II, jasmolina I e jasmolina II. A piretrina I é a mais importante para combater insetos e, por isso, foi utilizada como a base molecular para a síntese de piretroides (Figura 1). A atividade inseticida da piretrina I depende de toda a estrutura do éster, principalmente do grupo metil do C-2 no anel ciclopropano, localizado na porção ácida da molécula. Embora as piretrinas possuam a propriedade inseticida, estas moléculas são sensíveis à luz e ao ar, caracterizando-se como inseticidas com efetividade limitada na agricultura e no controle domissanitário (ELLIOTT, 1976; SODERLUND et al., 2002).

**Figura 1** - Fórmula estrutural da piretrina I, um inseticida natural extraído do crisântemo. A molécula é dividida em duas partes: a porção ácida e a porção álcool.



Fonte: SODERLUND et al, 2002.

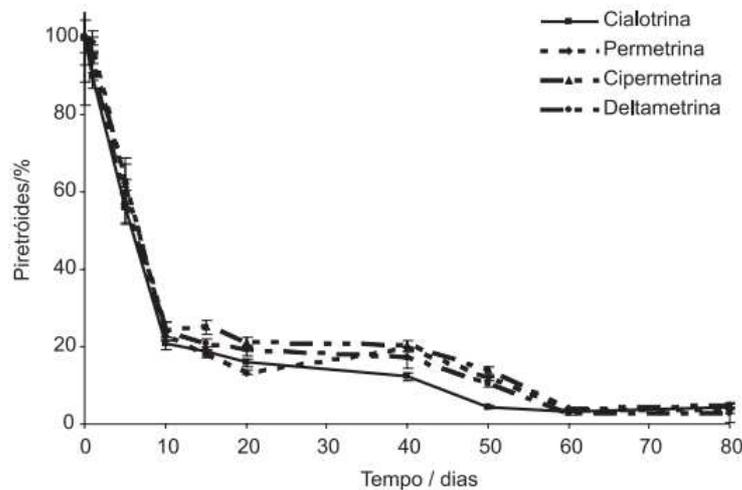
Devido à potente ação inseticida das piretrinas e sua baixa toxicidade para mamíferos, muitos estudos e pesquisas, desde a década de 1950, foram conduzidos para o desenvolvimento de inseticidas com propriedades semelhantes às piretrinas, mas sem as desvantagens que as mesmas apresentavam. Dessa forma, o desenvolvimento dos inseticidas piretroides é o resultado da modificação estrutural das piretrinas, que implicou na redução da fotoinstabilidade da molécula, na retenção da capacidade inseticida potente e de rápida ação e na manutenção da toxicidade, considerada relativamente baixa para os mamíferos (ELLIOTT, 1976; SODERLUND et al., 2002).

O primeiro piretroide desenvolvido foi a aletrina, por Schechter, Green e La Forge, em 1949. Entretanto, o primeiro piretroide comprovadamente eficiente para o uso agrícola foi a permetrina, devido à sua maior fotoestabilidade. Desde então, muitos outros piretroides foram sintetizados, como a tetrametrina, resmetrina, bioresmetrina, teflutrina, fenvalerato, bifentrina, ciflutrina, deltametrina, cipermetrina e  $\lambda$ -cialotrina (ELLIOTT, 1976; SODERLUND et al., 2002).

A adição do grupo  $\alpha$ -ciano na porção álcool, como ocorre na cipermetrina, produziu compostos com maior capacidade inseticida que a permetrina e com semelhante fotoestabilidade. Assim, surgiram duas grandes subfamílias dentro do grupo: os piretroides sem o grupo  $\alpha$ -ciano, chamados de piretroides I, e os com o grupo  $\alpha$ -ciano, denominados de piretroides II (SODERLUND et al., 2002). No grupo I, estão a bifentrina, a permetrina, a resmetrina, entre outros. No grupo II estão a deltametrina, a cipermetrina, a  $\lambda$ -cialotrina e a ciflutrina. Em mamíferos, a intoxicação por piretroides do tipo I provoca hiperatividade e tremores, enquanto que a intoxicação por piretroides do tipo II promove contorções, tonturas e coreoatetose (COATS, 2008).

Vieira et. al. (2007) avaliaram a persistência de cipermetrina, deltametrina,  $\lambda$ -cialotrina e permetrina, na água e sob condições laboratoriais (concentração inicial de cada piretroide foi de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , em pH 6,5 e com exposição indireta de luz). Estes autores observaram que os piretroides possuem pouca estabilidade no ambiente aquático, sendo que nos 10 primeiros dias ocorre uma rápida degradação, com perda de 80% do total, para todos os piretroides avaliados. Após 80 dias, restam apenas 3% da concentração inicial dos piretroides na água (Figura 2). A meia-vida estimada para estes piretroides foi de cinco dias. Para a Organização Mundial da Saúde, a persistência da cipermetrina em águas naturais é de 14 dias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1989).

**Figura 2** - Persistência (em porcentagem) dos piretroides  $\lambda$ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água por 80 dias.



Fonte: VIEIRA et al., 2007

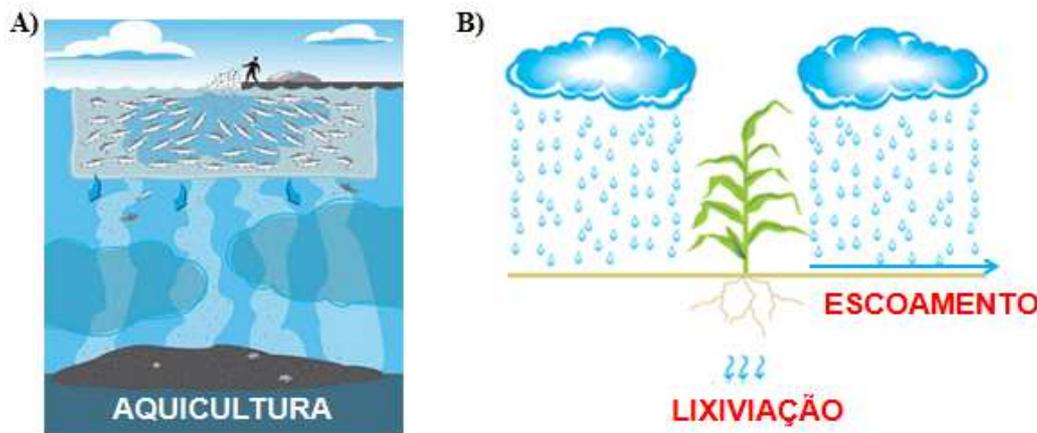
### 2.3. Os piretroides no ambiente aquático e seus mecanismos de ação

A utilização de agrotóxicos na agricultura e na aquicultura expõe os organismos aquáticos a uma série de contaminantes ambientais. Os prejuízos desta exposição nem sempre são agudos ou perceptíveis, mas os danos ambientais podem se estender por longo tempo até tornarem-se irreversíveis. Somado a este fato, tem-se a ascensão da aquicultura Brasileira (SUBASINGHE et al., 2009) que, embora seja rentável e benéfica ao desenvolvimento social e econômico do país, pode ser uma fonte geradora de poluição se o manejo sanitário não for adequado.

Muitos produtos químicos utilizados no controle de doenças na agricultura são utilizados para combater ectoparasitos de peixes (MEYER, 1991), tal como ocorre com os inseticidas piretroides. Os inseticidas piretroides são utilizados em sistema de criação de peixes em alguns países, como Noruega, Irlanda e Escócia (HART et al., 1997; SEPA, 1998; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2003; HAYA, 2005). No Brasil, esta prática não é regulamentada, ocorrendo de forma não regulamentada. Assim, os piretroides podem atingir o ambiente e os organismos aquáticos através da aplicação direta. Além disso, os piretroides podem atingir o ambiente aquático da forma indireta, visto que a utilização de piretroides em

áreas agrícolas e em campanhas de saúde pública pode carregá-los para os corpos d'água, por lixiviação e escoamento (Figura 3).

**Figura 3** - Os piretroides atingem o ambiente aquático por dois caminhos: **A)** pela aplicação direta em sistemas intensivos de criação de peixes, e **B)** pela aplicação indireta em áreas agrícolas e em campanhas de saúde pública, que pode carregá-los para os corpos d'água, por lixiviação e escoamento.



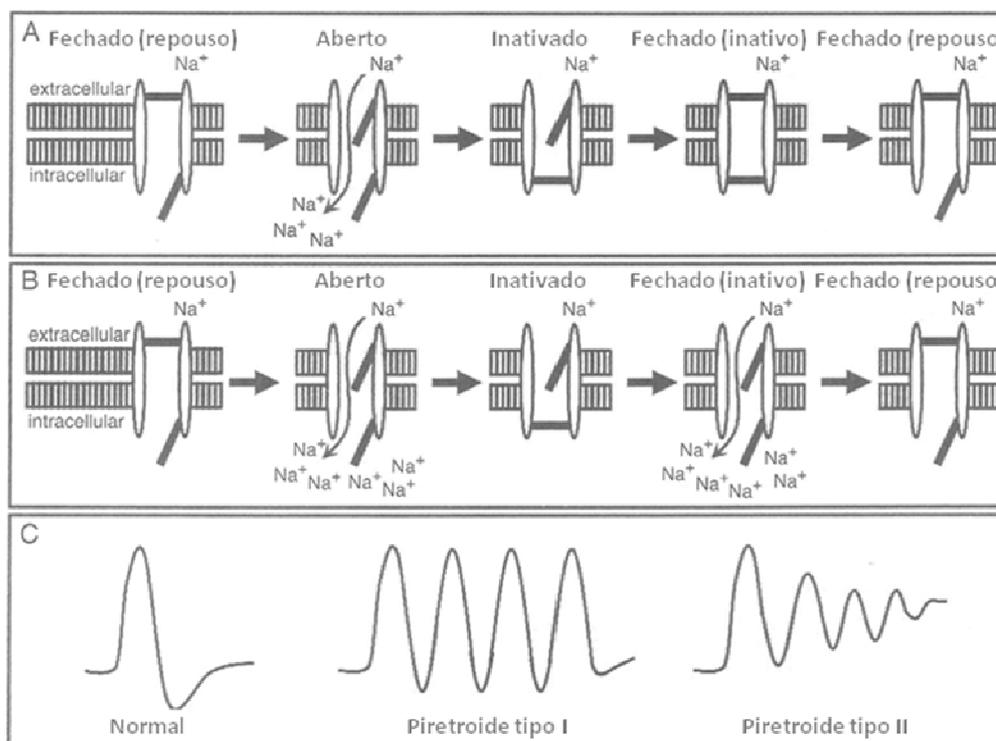
Fonte: Elaborado pela a autora.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na resolução 357/2005 (BRASIL, 2005a), não estabelece limites de piretroides em água doce. O Ministério da Saúde (MS) estabelece a concentração máxima de permetrina na água potável em  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (BRASIL, 2005b). No entanto, a utilização dos piretroides no país não está restrita à permetrina. Outros piretroides, principalmente os da classe II, estão sendo amplamente utilizados e registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Concentrações ambientais de piretroides acima dos limites aceitáveis pelo MS são relatados por Marino e Ronco (2005) e Belluta et al. (2010), os quais relatam concentrações de cipermetrina no ambiente aquático em  $194$  e  $111 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

O principal modo de ação dos piretroides consiste na alteração da permeabilidade dos canais de sódio voltagem-dependentes das células nervosas. Os piretroides do tipo I prolongam a abertura do canal de sódio, permitindo o maior influxo de sódio na célula e gerando repetidos potenciais de ação. Os piretroides do tipo II atrasam o fechamento do canal para o estado inativado, provocando inúmeras despolarizações, com amplitudes menores

(Figura 4) (SODERLUND et al., 2002; BRADBURY et al., 2008). Isso resulta na despolarização de membrana, descargas repetitivas e perturbações sinápticas que levam aos sintomas de intoxicação por hiperexcitabilidade (NARAHASHI, 1996; SODERLUND et al., 2002).

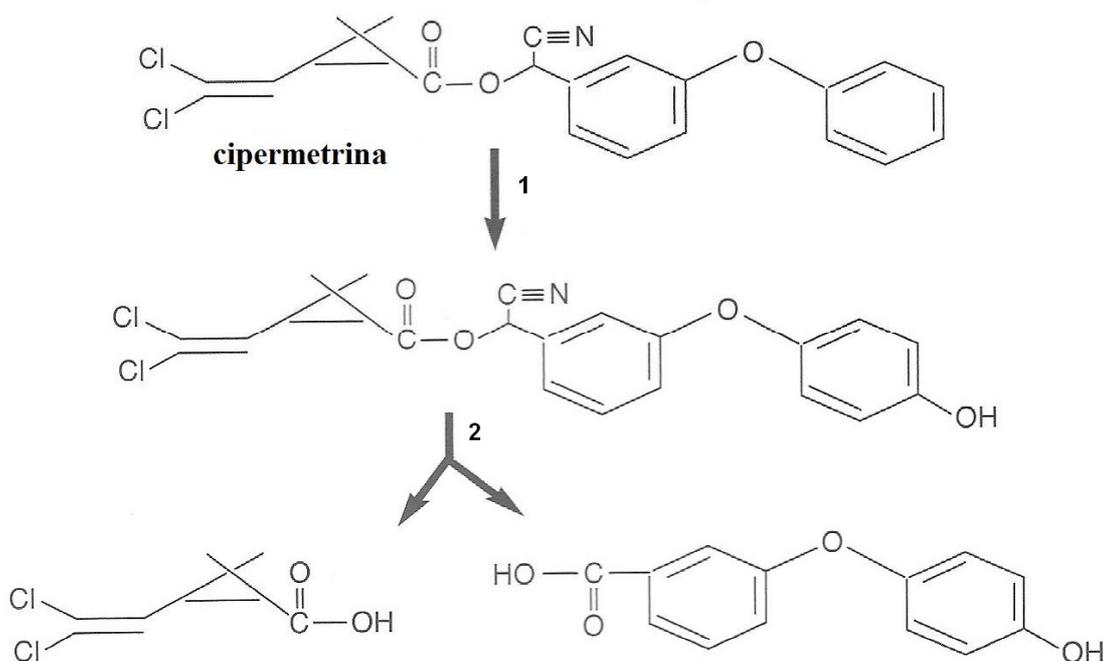
**Figura 4** - Representação gráfica do mecanismo de ação de piretroides nos canais de sódio voltagem-dependentes em células nervosas. **A)** No estado de repouso, o canal fica fechado ao ambiente extracelular. Em resposta ao estímulo, o canal se abre para permitir a entrada de sódio ( $\text{Na}^+$ ) na célula. Quando o estímulo cessa, o canal fecha as suas comportas intra e extracelulares para prevenir a entrada de  $\text{Na}^+$ ; então, a célula volta ao estado de repouso. **B)** Os piretroides podem afetar os canais de sódio voltagem-dependentes de duas formas. Os piretroides do tipo I prolongam a abertura dos canais de sódio na despolarização, gerando repetidos potenciais de ação. Os piretroides do tipo II retardam o fechamento do canal para o estado inativado. **C)** Comparação dos potenciais de ação dos canais de sódio voltagem-dependentes entre um potencial de ação normal, de exposição ao piretroide do tipo I e do tipo II. Enquanto os piretroides do tipo I promovem repetidos potenciais de ação, os piretroides do tipo II apresentam uma redução gradual na amplitude do potencial de ação, embora nunca retorne ao estado de repouso.



Fonte: traduzido de BRADBURY et al., 2008.

Para Haya (1989) a seletividade dos piretroides para os vertebrados encontra-se nesta ordem de sensibilidade: peixe > anfíbio > mamíferos > aves. Na maior parte dos vertebrados, os piretroides são metabolizados principalmente pelo fígado, sendo que a principal rota é a hidrólise do éster seguida de conjugação e excreção de conjugados pela bile (HAYA, 1989) (Figura 5). A formação de metabólitos primários e secundários, na metabolização de um piretroide, resulta em substâncias mais hidrossolúveis, o que facilita a sua excreção (KALE et al., 1999).

**Figura 5** - A via metabólica para a desintoxicação da cipermetrina dá-se via a hidroxilação-4' em peixes e vertebrados superiores, pela citocromo P450 (1). A reação de hidrólise por carboxilesterases (2) ocorre rapidamente em aves e mamíferos mas não em peixes. Esta deficiência contribui para o aumento da toxicidade de piretroides em peixes.



Fonte: adaptado de COATS, 2008.

Em peixes, a absorção de piretroides dá-se principalmente pelas brânquias e a excreção, pela bile, sendo que parcelas do composto original podem ser encontradas na gordura e no cérebro, e uma pequena porção dos metabólitos pode ser encontrada nas fezes e na urina (BRADBURY; COATS, 1989; COATS, 2008). A rota mais comum de biotransformação é a oxidação (hidroxilação) seguida de conjugação (com glucoronídeos,

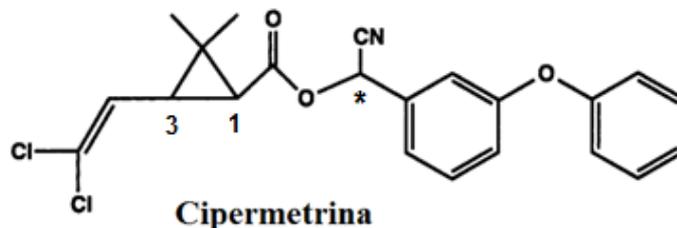
principalmente). Em peixes, a capacidade de hidrolisar parece ser comprometida e reduz a taxa de biotransformação, contribuindo fortemente para a susceptibilidade desses organismos aos piretroides (HAYA, 1989; COATS, 2008). Os peixes retêm os piretroides por muito tempo no organismo e parecem possuir baixo nível de carboxilesterases, enzimas responsáveis por hidrolisar estes compostos. Estudos relatam que algumas espécies de peixes podem ser deficientes em carboxilesterases (BRADBURY; COATS, 1989; HAYA, 1989). Sogorb e Vilanova (2002) afirmam que a taxa de eliminação de um xenobiótico está relacionada à sua toxicidade; assim, baixa atividade hidrolítica pode aumentar significativamente a toxicidade de um produto químico. Além disso, o caráter lipofílico dos piretroides permite que eles sejam absorvidos com facilidade pelas brânquias, contribuindo para a alta sensibilidade dos peixes a esta classe de inseticida (VIRAN et al., 2003; KUMAR et al., 2011).

Um mecanismo de ação secundário tem sido proposto e está relacionado às desordens osmorregulatórias, visto que os piretroides podem afetar canais de cálcio e as enzimas cálcio/magnésio ATPases (NARAHASHI, 1991; COATS, 2008).

#### **2.4. Cipermetrina e toxicidade em peixes**

A cipermetrina ( $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ ; nome químico: (RS) - alfa-ciano-3-enoxibenzil (1RS,3RS;1RS,3SR) - 3 - (2,2-diclorovinil) - 2, 2 - dimetilciclopropanocarboxilato) é um inseticida piretroide do tipo II registrado no Brasil para o controle de parasitas na produção agrícola, no controle de insetos vetores, na segurança domissanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007) e no controle de ectoparasitos em peixes, em outros países (SEPA, 1998; HAYA, 2005). A cipermetrina é uma molécula do tipo  $\alpha$ -ciano e contém três centros quirais, localizados nas posições 1 e 3 do anel ciclopropano e no carbono  $\alpha$ -benzil (Figura 6), possibilitando uma mistura racêmica de até oito isômeros. Os produtos técnicos contêm cipermetrina em uma razão *cis:trans* que pode variar de 50:50 a 40:60 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2006).

**Figura 6** - Fórmula estrutural da cipermetrina. O carbono 1, 3 e o  $\alpha$ -benzil (\*) são os três centros quirais da molécula.

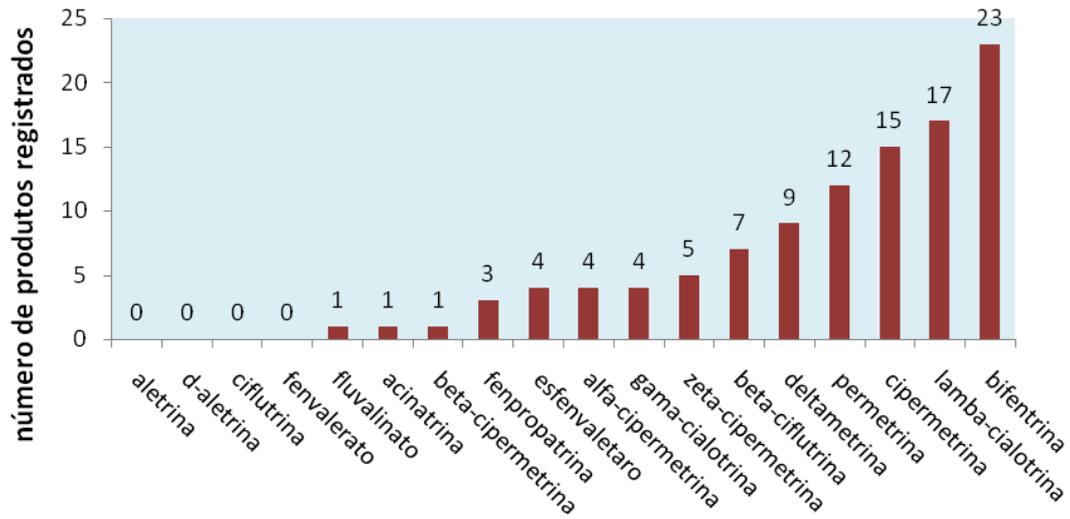


Fonte: adaptado de COATS, 2008.

A cipermetrina é registrada no Brasil para o uso agrícola, não agrícola e domissanitário. Na agricultura, produtos à base de cipermetrina podem ser aplicados nas folhas de culturas de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate. Outra modalidade de emprego é a aplicação no tronco e no caule, em cultura de maçã, e no solo, na cultura de fumo. O uso não agrícola da cipermetrina consiste em sua utilização para o controle de pragas domésticas como formigas, baratas, cupins, moscas e mosquitos. O emprego domissanitário compreende a utilização do ingrediente ativo em campanhas de saúde pública. A cipermetrina pode ainda ser utilizada como preservante de madeira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

Entre os piretroides, a cipermetrina é um dos princípios ativos com maior número de registros em produtos comerciais apontados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2013). Atualmente, existem 18 ingredientes ativos piretroides registrados no Brasil (Figura 7), sendo que a cipermetrina está presente em 15 produtos comerciais que somada à alfa-cipermetrina (4 produtos), beta-cipermetrina (1 produto) e zeta-cipermetrina (5 produtos) (BRASIL, 2013) compõem o grupo de piretroides do tipo II com maior representatividade comercial no Brasil.

**Figura 7** - Quantidade de produtos comerciais registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, cujos ingredientes ativos são piretroides.



Fonte: BRASIL, 2013.

Em outros países, a cipermetrina é registrada para o tratamento de ectoparasitos em animais de criação intensiva, como porcos, bovinos, caprinos, ovinos e equinos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2003; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2008). A Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais relata sobre a utilização de cipermetrina para o tratamento e controle de ectoparasitos em salmonídeos. O tratamento consiste na utilização de 5,0 µg de cipermetrina (cis:trans 40:60) por litro de água salgada durante o período de uma hora (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2003). Para Hart et al. (1997), o salmão *Salmo salar* tratado com 5,0 µg L<sup>-1</sup> de cipermetrina apresentou uma redução de cerca de 98% de piolho do mar *Lepeophtheirus salmonis*.

Na Noruega, Irlanda e Escócia, a cipermetrina é registrada e utilizada no combate aos ectoparasitos em peixes (HAYA, 2005). Embora a cipermetrina, assim como outros inseticidas, não seja registrada no Brasil para a aquicultura, sabe-se que muitos deles são utilizados em pisciculturas. Essa atividade não regulamentada se mantém, pois muitos produtos utilizados na agricultura para controlar doenças em outros animais apresentam eficácia no combate aos parasitas de peixes (MEYER, 1991).

A cipermetrina, bem como outros piretroides, é danosa para os peixes (COATS, 2008), como observado em testes de toxicidade aguda para a tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* (BRADBURY; COATS, 1989), a carpa comum *Cyprinus carpio* (SVOBODOVA et

al., 2003), o lebiste *Poecilia reticulata* (YILMAZ et al., 2004), a carpa *Labeo rohita* (SARKAR et al., 2005) e para o bagre *Clarias batrachus* (KUMAR et al., 2011).

A cipermetrina provoca efeitos danosos em várias espécies de peixes, mesmo em concentrações subletais. Ela é genotóxica (ANSARI et al., 2011; JIN et al., 2011) e pode provocar uma série de alterações ao sistema antioxidante, resultando em peroxidação lipídica (ANSARI et al., 2011; JIN et al., 2011) e indução da expressão gênica de enzimas antioxidantes (JIN et al., 2011). Além disso, alterações hematológicas tempo-dependentes (ADHIKARI et al., 2004) e alterações nos padrões de comportamento (BORGES et al., 2007; JAENSSON et al., 2007) e nas concentrações de metabólitos e íons plasmáticos, decorrentes de danos hepáticos (BORGES et al., 2007) são relatados em peixes expostos ao piretroide. A cipermetrina é capaz de reduzir a fertilidade de ovos e a sobrevivência de alevinos do jundiá *Rhamdia quelen* expostos a concentrações subletais (MONTANHA et al., 2012). *B. amazonicus* exposta a 0,26 µg L<sup>-1</sup> de deltametrina apresenta estresse oxidativo e aumento na atividade das aminotransferases (ALAT e ASAT) plasmáticas, indicando que os piretroides podem ser hepatotóxicos (CORTELLA, 2010). Inibição da AChE cerebral (KUMAR et al., 2009) e desordens osmorregulatórias e histopatológicas em brânquias (AL-GHANBOUSI et al., 2012) são resultantes da exposição subletal à cipermetrina.

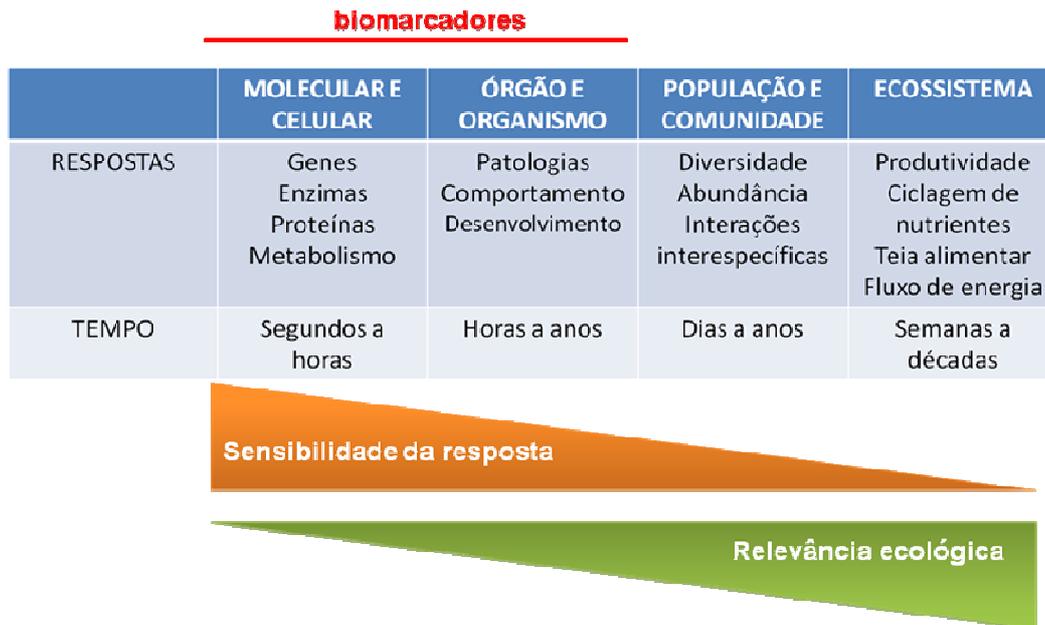
Os danos decorrentes da exposição subletal podem causar prejuízos à sanidade dos peixes, ao meio ambiente e à saúde humana. A identificação de marcadores biológicos que mostrem precocemente a presença de piretroides na água pode evitar o aparecimento de prejuízos em longo prazo, como o baixo crescimento, baixa taxa de reprodução e de sobrevivência dos peixes. Algumas respostas biológicas têm se revelado biomarcadores potenciais de contaminação ambiental por agrotóxicos e são discutidas na seção 2.5.

## 2.5. Biomarcadores

Biomarcador é qualquer mudança na resposta biológica (de respostas moleculares até respostas do organismo como um todo) que está relacionada aos efeitos tóxicos de produtos químicos no ambiente (PEAKALL, 1999). Estas respostas biológicas são os primeiros sinais de alerta de danos que poderiam ocorrer em alto nível de organização biológica, mas que podem ser constatadas em alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas e comportamentais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; SCHLENK et al., 2008). Para Schlenk et al. (2008) as respostas que ocorrem em nível molecular até órgão/organismo são sensíveis,

detectáveis em um curto período de tempo (segundos até horas) e se manifestam em baixas concentrações de xenobióticos. As respostas que ocorrem em nível populacional até ecossistema não são muito sensíveis e se manifestam em dias até décadas, embora possuam alta relevância ecológica (Figura 8).

**Figura 8** - Relação de tempo de resposta, sensibilidade e relevância ecológica de respostas típicas em condições de estresse associadas com os níveis de organização biológica.



Fonte: adaptado de SCHLENK et al., 2008.

As análises de metabólitos, enzimas e outras variáveis bioquímicas em tecidos e fluidos corpóreos são utilizadas para se estudar a interação de xenobióticos com o sistema biológico (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Para Scott e Sloman (2004) as alterações no metabolismo de peixes, decorrentes da exposição à xenobióticos, podem ser verificadas através das alterações nas concentrações de substratos metabólicos, enzimas e pelo comportamento.

Os biomarcadores podem ser divididos em três classes: biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e patológicos (ou histológicos, para alguns autores) (RAND et al., 1995; SCHLENK et al., 2008).

Os biomarcadores bioquímicos são as respostas iniciais e indicadores bastante sensíveis de alterações na função celular. Dentro deste grupo encontram-se a indução ou inibição de proteínas (enzimas antioxidantes, enzimas de biotransformação, enzimas do

sistema neuromuscular, metalotioneínas, família HSP70 e proteínas de resistência a multidrogas, como as glicoproteínas-P), a quantificação de metabólitos endógenos (modificados pela metabolização de drogas) e as alterações genotóxicas (OOST et al., 2003; SCHLENK et al., 2008). Vale ressaltar que a indução de proteínas é um dos principais mecanismos de defesa às injúrias celulares provocadas por produtos tóxicos. Dependendo da dose (ou concentração) do produto tóxico, este sistema de defesa pode ser adaptativo; contudo, quando a concentração excede a capacidade do sistema funcionar normalmente, as células sofrem injúrias irreversíveis e tóxicas. Dessa forma, a avaliação da indução de proteínas (com ou sem função catalítica) pode elucidar mecanismos de toxicidade em nível celular (SCHLENK et al., 2008).

Os biomarcadores fisiológicos são aqueles observados em nível celular, tecido, órgão até organismo e compreendem alguns “endpoints” como: variáveis hematológicas, índices hematimétricos, íons, enzimas e metabólitos plasmáticos, hormônios circulantes, índices organosomáticos, fator de condição (peso/comprimento), crescimento, respostas respiratórias e cardiovasculares, e o comportamento animal (SCHLENK et al., 2008).

Os biomarcadores patológicos são as mudanças histológicas e a ocorrência de patologias que podem mudar significativamente a função dos tecidos e dos órgãos (SCHLENK et al., 2008). As alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar à formação de lesões nos tecidos ou nos órgãos. Para Schwaiger (1997) a histopatologia pode complementar os resultados referentes às respostas bioquímicas e fisiológicas em peixes expostos a diversos estressores ambientais. Por isso, a histologia representa uma ferramenta útil para se avaliar o grau de poluição aquática, principalmente em concentrações subletais e crônicas (BERNET et al., 1999). Alguns órgãos são mais adequados para se avaliar as agressões provocadas por estes estressores, como as brânquias, que estão em contato direto e permanente com os estressores químicos (BERNET et al., 1999).

### **2.5.1. Biomarcadores bioquímicos e piretroides**

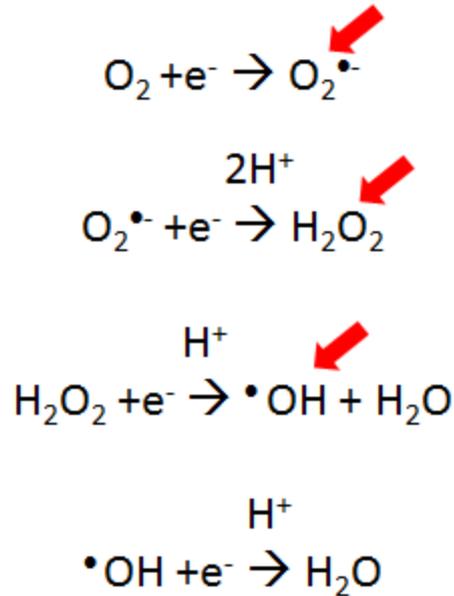
#### *Estresse oxidativo*

O ambiente aquático recebe cada vez mais produtos químicos provenientes das indústrias, agricultura, da aquicultura e dos efluentes domésticos, os quais atingem os organismos aquáticos e perturbam os processos de geração e degradação de radicais livres.

Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que possuem elétrons desemparelhados. Estes elétrons desemparelhados são muito reativos e podem participar de muitas reações químicas (DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011). Os radicais livres podem derivar do oxigênio, as espécies reativas de oxigênio (ERO), ou do nitrogênio, chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (JEZEK; HLAVATÁ, 2005). As ERO incluem radicais como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o ácido hidroperoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ), o hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), o carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ), o peroxil ( $RO_2^{\bullet}$ ) e o alcoxil ( $RO^{\bullet}$ ). Algumas espécies não radicais também são descritas como ERO, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ácido hipocloro ( $HOCl$ ), hidroperóxidos de ácidos graxos (FAOOH), aldeídos reativos, oxigênio *singlete* e outros compostos. As ERN compreendem o óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ), o dióxido de nitrogênio ( $^{\bullet}NO_2$ ) e não radicais, como o peroxinitrito ( $OONO^{\bullet}$ ),  $N_2O_3$ , *N*-nitrosaminas, *S*-nitrosotíols e outros compostos (JEZEK; HLAVATÁ, 2005; DI GIULIO; MEYER, 2008).

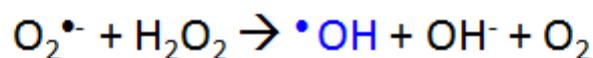
As ERO são os oxidantes mais estudados e são subprodutos da redução parcial da molécula de oxigênio ( $O_2$ ) a água ( $H_2O$ ), que ocorre por um mecanismo que envolve quatro elétrons, pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Figura 9). Estes subprodutos são reativos, embora nem todos se classifiquem como um radical livre, como ocorre com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011). O superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é um radical livre fracamente reativo, enquanto que o radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ) é extremamente reativo e capaz de provocar danos às células, embora tenha um período de vida curto. Embora o  $H_2O_2$  seja um fraco oxidante/redutor, ele consegue penetrar facilmente na célula por não ter carga e é um forte precursor da  $^{\bullet}OH$ , via reação descrita por Haber e Weiss, em 1934 (Figura 10). Contudo, a reação de Haber-Weiss em solução aquosa, embora termodinamicamente favorável, é muito lenta; a reação pode ser catalisada por metais de transição (como ferro) e ficou conhecida como reação de Fenton (DI GIULIO; MEYER, 2008).

**Figura 9** - Na mitocôndria, a cadeia transportadora de elétrons gera ERO naturalmente durante a redução do  $O_2$ . As setas vermelhas indicam as ERO formadas, sendo que o primeiro é o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o segundo é a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o terceiro é o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ).



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 10** - Reação proposta por Haber e Weiss, na qual o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pode reagir com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e formar o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) (em azul), que é o mais reativo e tóxico às biomoléculas. Esta reação pode ser catalisada por metais de transição, sendo assim chamada de reação de Fenton.



Fonte: Elaborada pela autora.

Devido à alta capacidade das ERO em danificar o sistema biológico, o metabolismo das mesmas está sobre um controle celular fino e suas concentrações geralmente não excedem a  $10^{-8}$  M (LUSHCHAK, 2011). Pelo fato de as ERO serem constantemente geradas e eliminadas, a sua concentração deve ser vista como um parâmetro dinâmico, que também é conhecido como concentração basal das ERO. Estas concentrações refletem as oscilações das

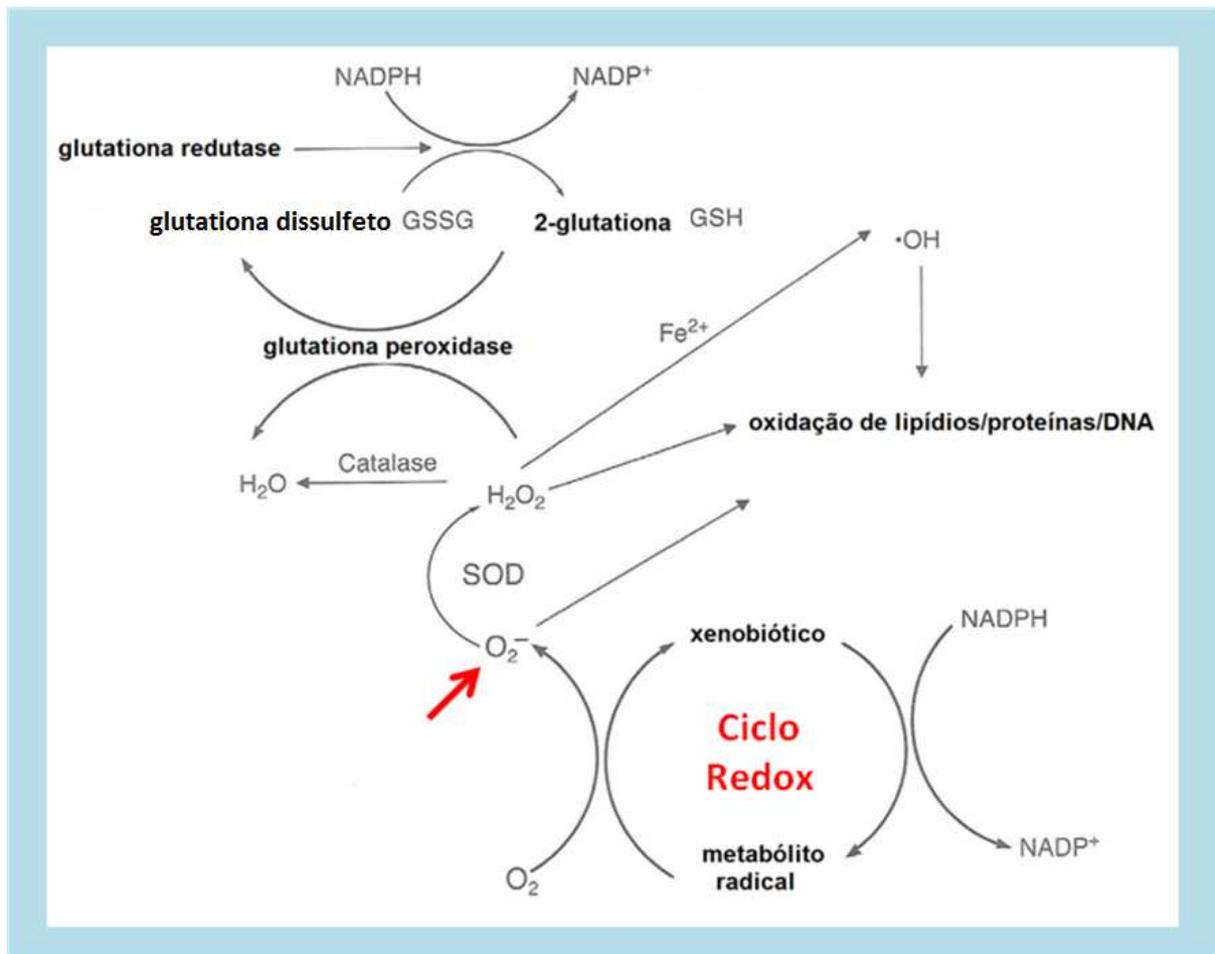
ERO no organismo e envolvem um espectro de concentrações consideradas naturais aos organismos. Isto significa que a quantidade de ERO produzida é virtualmente eliminada. Entretanto, se por alguma razão as concentrações de ERO alterarem, liderando um distúrbio do estado redox com aumento da concentração de ERO, observa-se o que chamamos de estresse oxidativo (SIES, 1997; LUSHCHAK, 2011).

As ERO podem ser geradas dentro da célula por múltiplos mecanismos. O principal sítio de geração ocorre na cadeia transportadora de elétrons. A Coenzima Q e o complexo III mitocondriais são os principais pontos da cadeia transportadora onde ocorre o “escape” de elétrons, os quais interagem com o oxigênio molecular, formando assim o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (JEZEK; HLAVATÁ, 2005; LUSHCHAK, 2011).

O segundo local mais importante para a formação de ERO é a cadeia transportadora do retículo endoplasmático. Nesta organela, o catabolismo de produtos celulares e de xenobióticos, pelo citocromo P450, necessita de mecanismos redox, os quais são responsáveis por gerar as ERO (Figura 11). O ciclo redox envolve a redução univalente do xenobiótico (composto primário) a um metabólito radical por enzimas como a xantina oxidase e o NADPH-citocromo P450 redutase. O metabólito radical então transfere um elétron para o  $O_2$ , produzindo o  $O_2^{\bullet-}$  e regenerando o composto primário. Dessa forma, uma única molécula de composto primário pode gerar muitos oxirradicais, às custas de equivalentes redutores, ou seja, a um alto custo energético para a célula (KELLY et al., 1998). O ciclo redox pode ocorrer na presença de difenóis, quinonas, nitroaromáticos, certos metais (como cobre e ferro) e agrotóxicos (DI GIULIO; MEYER, 2008). Além disso, a hemoglobina e a mioglobina podem gerar o  $O_2^{\bullet-}$ , que ao interagir com o Fe (II), produz o Fe (III) no grupo heme, que é incapaz de se ligar ao  $O_2$  e é conhecida como metahemoglobina (DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011).

A produção de ERO nem sempre está associada aos danos celulares. Algumas células, como os leucócitos, possuem um sistema de produção específica de ERO. Este sistema é regulado pela NADPH-oxigenase e as ERO produzidas por este sistema são utilizadas para atacar microorganismos invasores, conferindo à célula um papel protetor (LUSHCHAK, 2011).

**Figura 11** - Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo ciclo redox, no retículo endoplasmático. A redução do xenobiótico (composto primário) pela NADPH-citocromo P450 redutase gera um metabólito radical. O metabólito radical pode transferir um elétron para o  $O_2$  produzindo o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), indicado pela seta vermelha. O composto primário é regenerado a um alto custo de energia para a célula. A partir do  $O_2^{\bullet-}$  outras ERO podem surgir, como o hidroperóxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ).



Fonte: adaptado e traduzido de SCHLENK et al., 2008.

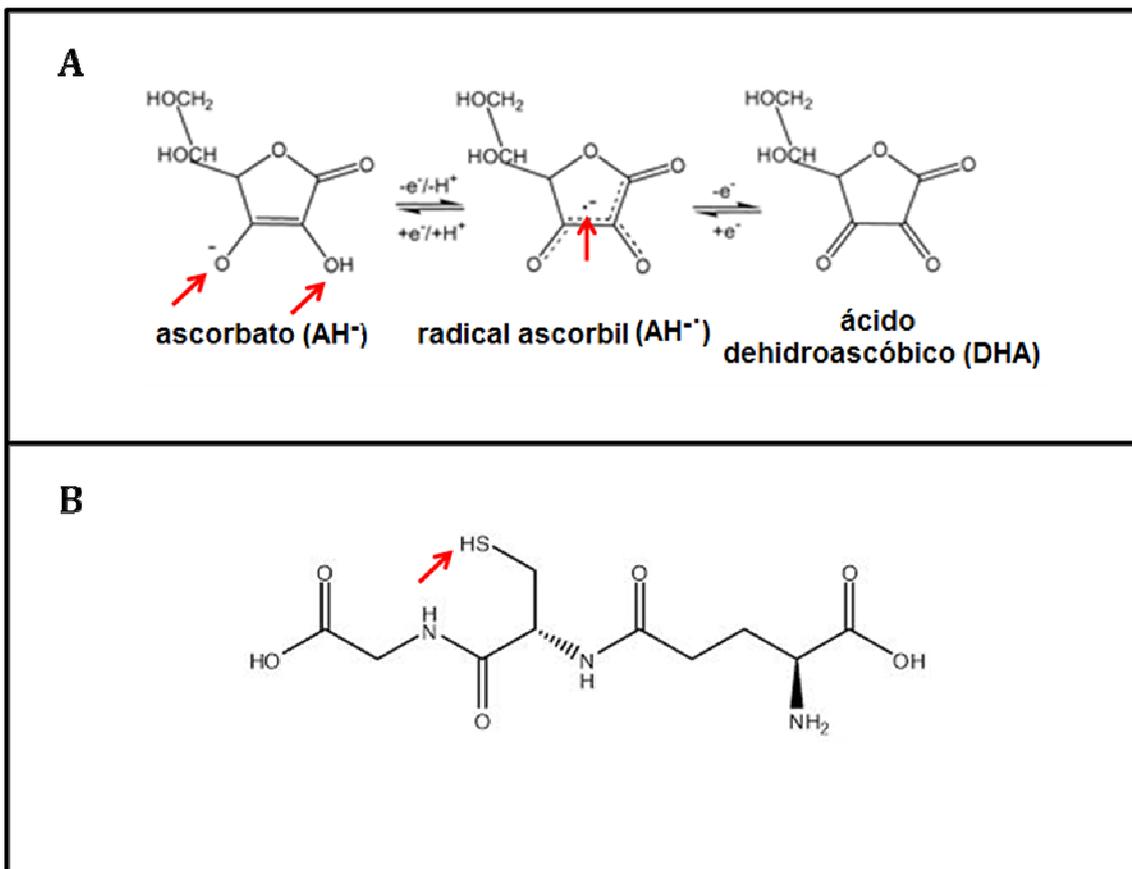
Os contaminantes ambientais podem induzir o estresse oxidativo através de alguns mecanismos: 1) inibindo ou desacoplando a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria ou no retículo endoplasmático; 2) entrando no ciclo redox, aceitando ou doando elétrons aos constituintes celulares; 3) envolvendo-se com moléculas redutoras, como a glutatona; 4) inativando as enzimas antioxidantes; e 5) interferindo nos processos necessários ao fornecimento de energia, de forma a reduzir o suprimento energético aos processos de desintoxicação (DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011). Os oxidantes são

formados como um produto natural do metabolismo aeróbico, porém podem ter suas concentrações elevadas diante de uma condição fisiopatológica (SIES, 1997). Buscando a estabilidade, os radicais livres atacam as moléculas mais próximas para obter outro elétron, danificando assim a estrutura e a função da molécula doadora (ABDOLLAHI et al., 2004).

Contudo, as ERO podem ser removidas pelo sistema antioxidante, que é formado por moléculas com alta e baixa massa molecular. Entende-se por antioxidante qualquer substância que combate ou inibe os danos oxidativos. Estas moléculas são capazes de neutralizar os radicais livres através da doação de elétrons para eles (ABDOLLAHI et al., 2004; DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011).

Antioxidantes com baixa massa molecular incluem alguns compostos solúveis em água, como a glutathiona (GSH) e o ácido ascórbico (Figura 12), e alguns solúveis em lipídios, como os carotenóides, o retinol e o  $\alpha$ -tocoferol. Em pH fisiológico, o ácido ascórbico (ou vitamina C) é encontrado principalmente como ascorbato e é altamente solúvel em água. Além de ser um agente antioxidante, o ascorbato serve com cofator para inúmeras enzimas, como a prolina hidroxilase e a lisina hidroxilase, envolvidas na síntese do colágeno. A GSH é um tripeptídeo ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) com inúmeras funções na célula, entre elas a antioxidante. A GSH participa da reação acoplada catalisada pela glutathiona peroxidase (GPx), de forma a reduzir peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos de lipídios (LOOH). Além disso, a GSH pode agir diretamente nas ERO ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ), com o seu grupo tiol ( $-SH$ ) (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008).

**Figura 12** - Antioxidantes não enzimáticos. **A)** O ascorbato é um potente agente redutor, inclusive contra as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo por isso chamado de antioxidante. **B)** A glutatona (GSH) participa da reação acoplada catalisada pela glutatona peroxidase (GPx) e pode agir diretamente nas ERO ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ), com o seu grupo tiol ( $-SH$ ) (texto adaptado de Di Giulio e Meyer, 2008). As setas indicam os locais da molécula antioxidante capazes de sofrer oxidação, com doação de elétrons para os oxidantes.



Fonte: Elaborado pela a autora.

Os antioxidantes com alta massa molecular compreendem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) (Figura 13). A SOD catalisa a dismutação do superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), aceitando um elétron de outro  $O_2^{\bullet-}$ . Os vertebrados possuem três isoformas de SOD: a CuZnSOD, que aparece predominantemente no citosol, mas podem ocorrer também nos lisossomos e no núcleo; a MnSOD, que ocorre principalmente na mitocôndria; e a SOD extracelular (ECSOD), que é abundante nos espaços extracelulares de vasos sanguíneos. A CAT é encontrada, principalmente, nos peroxissomos, visto que a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos dá-se nesta organela e gera como subproduto o  $H_2O_2$ , substrato dessa enzima. A CAT pode atuar também no metabolismo de  $H_2O_2$  fora desta

organela, conferindo a esta enzima, capacidade antioxidante contra este radical, formado por outros meios. A GPx é outro mecanismo que a célula dispõe para eliminar o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso, esta enzima pode reduzir os LOOH, desde que eles não estejam esterificados à membrana. Em mamíferos, foram descritas quatro isoformas: a GPx1 (clássica), GPx2 (gastrointestinal), GPx3 (plasmática) e a GPx4 (reduz LOOH associados às membranas). Em peixes, a isoforma que predomina é a GPx1, que é capaz de reduzir tanto  $\text{H}_2\text{O}_2$  como o LOOH, gerando assim os correspondentes alcoóis: água e LOH, respectivamente. A GSH é utilizada em ambas as reduções como co-substrato da enzima (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008).

**Figura 13** - Antioxidantes enzimáticos. **A)** A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), aceitando um elétron de outro  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . **B)** A catalase (CAT) elimina os  $\text{H}_2\text{O}_2$  dentro e fora dos peroxissomos. **C)** A glutathiona peroxidase (GPx) é outro mecanismo que a célula dispõe para eliminar o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso, esta enzima pode reduzir hidroperóxidos de lipídios (LOOH), desde que eles não estejam esterificados à membrana. A glutathiona (GSH) é utilizada em ambas as reduções como co-substrato desta enzima (Texto adaptado de Di Giulio e Meyer, 2008).

|          |   |
|----------|---|
| <b>A</b> | <b>Superóxido Dismutase (SOD)</b>   |
|          | $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ |
| <b>B</b> | <b>Catalase (CAT)</b>   |
|          | $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$                         |
| <b>C</b> | <b>Glutathiona Peroxidase (GPx)</b>   |
|          | $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$             |
|          | $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{LOH}$                              |

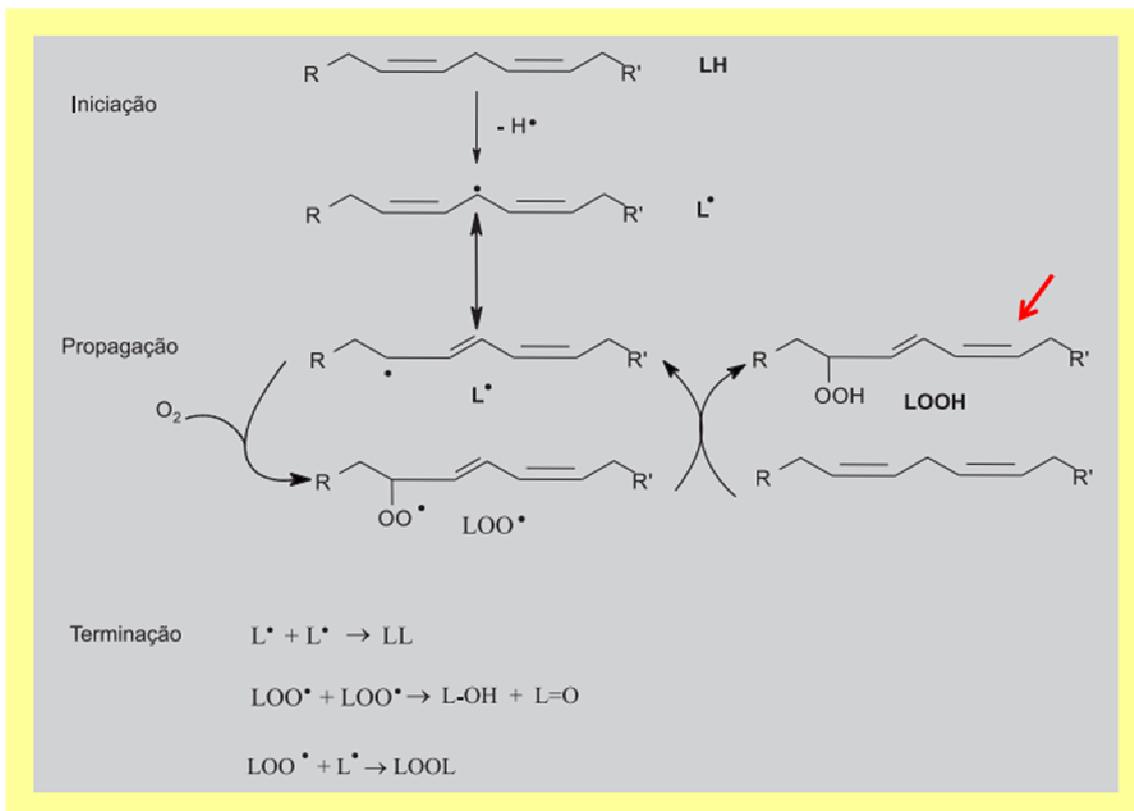
Fonte: Elaborado pela a autora.

A glutathione redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) são enzimas diretamente ligadas à manutenção do sistema antioxidante. A GR regenera a glutathione (GSH) a partir de glutathione dissulfeto (GSSG), com auxílio de elétrons do NADPH. A G6PDH participa da via das pentoses, que sintetiza NADPH. Os mecanismos de defesa, principalmente as enzimas antioxidantes, têm sido conservados ao longo da evolução. Entre os vertebrados, a maioria destes mecanismos é similar; algumas diferenças aparecem entre filós, que são geralmente mais quantitativas que qualitativas (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011).

O aumento significativo das ERO, e conseqüentemente a redução da capacidade antioxidante, podem ser danosos às biomoléculas, incluindo os lipídeos, as proteínas e o DNA (GUTTERIDGE, 1995; JEZEK; HLAVATÁ, 2005).

Os lipídios podem ser oxidados pelas ERO, dando origem aos hidroperóxidos. Este processo é conhecido como peroxidação lipídica (LPO, *Lipid Peroxidation*). A detecção e quantificação da LPO é a evidência mais frequentemente relatada para suportar as oxidações provocadas por ERO, e é um excelente biomarcador para danos celulares (GUTTERIDGE, 1995). A LPO é dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Basicamente, a fase de iniciação dá-se quando os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares, inclusive nas organelas, têm seus hidrogênios alílicos sequestrados pelas ERO. Quando ocorre esse sequestro, há a formação do radical alquila ( $L^{\bullet}$ ), que pode se conjugar com um oxigênio, formando assim o radical peroxila ( $LOO^{\bullet}$ ). O  $LOO^{\bullet}$  pode sequestrar um hidrogênio alílico de outro ácido graxo gerando um hidroperóxido de lipídio ( $LOOH$ ) e outro  $L^{\bullet}$ , promovendo assim a etapa de propagação. A etapa de terminação ocorre pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (Figura 14) (GUTTERIDGE, 1995; LIMA; ABDALLA, 2001).

**Figura 14** - A peroxidação lipídica é uma reação em cascata dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação. A iniciação ocorre quando os ácidos graxos poliinsaturados (LH) têm seus hidrogênios alílicos ( $H^\bullet$ ) sequestrados por espécies reativas, gerando assim um radical alquila ( $L^\bullet$ ). Na presença de oxigênio, o  $L^\bullet$  origina o radical peroxila ( $LOO^\bullet$ ). O  $LOO^\bullet$  pode sequestrar outro  $H^\bullet$  de outros ácidos graxos poliinsaturados, dando assim origem ao hidroperóxido de lipídio (LOOH) e iniciando a propagação da reação. A fase de terminação ocorre com a reação entre os radicais de lipídio formando produtos não radicalares. A seta indica o produto primário da peroxidação lipídica que pode ser quantificado pelo método FOX (Ferrous Oxidation/ Xylenol).



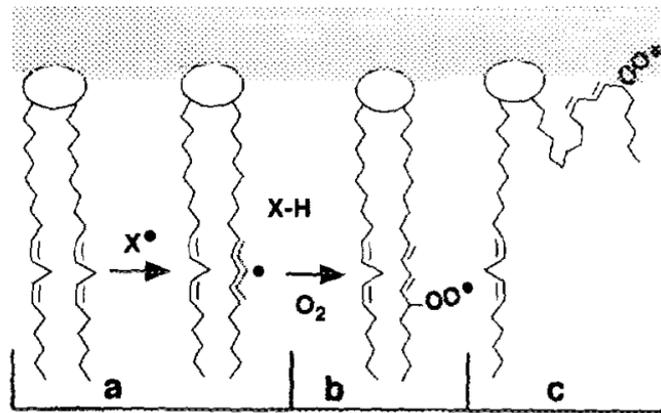
Fonte: adaptado de LIMA; ABDALLA, 2001.

Muitos danos são decorrentes da peroxidação lipídica, como a desestabilização das membranas (Figura 15), o extravasamento de enzimas lisossomais no citosol, o aumento da permeabilidade da membrana celular, a diminuição de sua fluidez e a inibição de enzimas ligadas à membrana (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008).

Os hidroperóxidos são produtos primários da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e podem ser quantificados colorimetricamente pelo método FOX (Ferrous Oxidation/ Xylenol). O princípio deste método consiste na oxidação do ferro II a ferro III

pelos hidroperóxidos, sendo que o ferro III reage com o xilenol laranja e produz um cromóforo que absorve em 560nm (JIANG et al., 1992).

**Figura 15** - Peroxidação lipídica (LPO). **A)** iniciação do processo de LPO por um radical livre e sequestro de um hidrogênio alílico, seguido da oxigenação do radical. **B)** formação do radical peroxila. **C)** hidroperóxido de lipídio.



Fonte: modificado de BUETTNER (1993)

Ataques oxidativos às proteínas podem resultar em modificações de aminoácidos sítio-específicas, fragmentação da cadeia polipeptídica, alteração de cargas elétricas nos aminoácidos e aumento na suscetibilidade e degradação da proteína (LESSER, 2012), levando assim à inativação de enzimas. Entretanto, o componente celular mais sensível as ERO é o DNA (LESSER, 2012). As ERO podem causar muitos danos ao DNA, como degradação de bases nitrogenadas, quebra de fita simples e dupla, e ligações cruzadas do DNA com proteínas. As alterações nucleares decorrentes da exposição à xenobióticos podem ser evidenciadas através da avaliação de micronúcleos e pelo teste do cometa. O teste do cometa é sensível, amplamente utilizado em organismos aquáticos e permite detectar danos até mesmo em baixas concentrações de xenobióticos (JHA, 2008). O princípio deste método será discutido posteriormente, nesta seção.

Muitos trabalhos relatam as alterações no sistema antioxidante e na integridade da membrana citoplasmática e do DNA em organismos aquáticos expostos aos piretroides. O paulistinha *Danio rerio* apresenta indução das enzimas hepáticas SOD, CAT e GPx e alterações nucleares quando exposto à cipermetrina (JIN et al., 2011). *Channa punctatus* exposta ao mesmo princípio ativo apresenta aumento da peroxidação lipídica, inibição da SOD e indução da GSH em eritrócitos (ANSARI et al., 2011). As espécies *C. punctatus* e *O.*

*niloticus* expostas à deltametrina e  $\lambda$ -cialotrina, respectivamente, apresentam aumento da LPO e da concentração de GSH em fígado (SAYEED et al., 2003; PINER; ÜNER, 2012). *C. carpio* exposta a concentrações subletais de deltametrina apresenta aumento de LPO, da atividade da CAT e da GR em fígado (ENSIBI et al., 2013).

Para Kelly et al. (1998), a similaridade das respostas adaptativas e toxicológicas ao estresse oxidativo entre mamíferos e peixes reforçam a importância da utilização do peixe como modelo em toxicologia. Assim, os estudos com peixes, além daqueles realizados em mamíferos, poderão levar a uma melhor compreensão de como as células respondem e reparam os danos oxidativos e ainda, como estes danos podem levar aos quadros patológicos.

### *Neurotoxicidade*

Os xenobióticos que são capazes de alterar os canais iônicos de células nervosas e a transmissão química nas sinapses podem provocar efeitos neurotóxicos. Os efeitos neurotóxicos de agentes químicos podem ser acessados pela quantificação de respostas em nível molecular até organismo, as quais podem esclarecer os mecanismos de ação de drogas (BRADBURY et al., 2008).

Os piretroides são moléculas sintéticas cuja principal finalidade é atingir e danificar o sistema nervoso dos organismos-alvo. Entretanto, muitos organismos não alvos estão sujeitos à ação neurotóxica desses inseticidas, como ocorre para peixes (KUMAR et al., 2009; HERNÁNDEZ-MORENO et al., 2010), ratos (HOUSSAIN et al., 2004), abelhas (BADIOU; BELZUNCES, 2008), entre outros. Haya (1989) relata que a permetrina, o fenvalerato e a cipermetrina são encontradas no cérebro de peixes mesmo após 48 horas de exposição em sistema estático.

O modo de ação dos piretroides consiste na alteração da permeabilidade dos canais de sódio voltagem-dependentes das células nervosas, resultando no aumento do fluxo iônico de sódio para dentro das células e na geração de um potencial de ação (SODERLUND et al., 2002), conforme discutido na seção 2.3. Embora o mecanismo primário de neurotoxicidade dos piretroides sejam os canais de sódio, existem evidências de outros sítios de ação, como os canais de cloreto e potássio voltagem-dependentes e canais GABAérgicos (SODERLUND et al., 2002; BRADBURY et al., 2008). Tanto os piretroides do tipo I quanto II provocam repetidas despolarizações nas sinapses, tanto no sistema nervoso central (SNC) como nas junções neuromusculares; como consequência, a intoxicação por piretroides tem sido associada com a liberação de acetilcolina, GABA, dopamina e norepinefrina (BRADBURY et al., 2008).

As manifestações da neurotoxicidade dos piretroides podem ser verificadas pelos sinais de intoxicação do animal e pelo ensaio de uma enzima clássica em ecotoxicologia, a acetilcolinesterase (AChE). A relação entre a alteração comportamental e a atividade da AChE é muito estudada em peixes exposto a inseticidas (REDDY et al., 1992; BREWER et al., 2001). A AChE é a enzima responsável por inativar a acetilcolina (ACh), hidrolisando-a em acetato e colina. A AChE está presente na fenda sináptica e nas junções neuromusculares de vertebrados, e o seu modo de ação é a rápida remoção da ACh, impedindo assim que este neurotransmissor excite novamente a célula pós-sináptica. A inibição da AChE cerebral pode provocar acúmulo de ACh nas junções sinápticas, ocasionando alterações comportamentais e fisiológicas que podem afetar a saúde do animal até levá-lo à morte (REDDY et al., 1992; WHEELLOCK et al., 2005).

Nos últimos anos, o comportamento tornou-se uma ferramenta útil na compreensão dos efeitos de poluentes ambientais em peixes, pois o comportamento é o resultado integrado de processos endógenos e exógenos e permite ligar processos fisiológicos a ecológicos (BREWER et al., 2001; SCOTT; SLOMAN, 2004). A  $\lambda$ -cialotrina provoca hiperatividade, perda de equilíbrio, convulsões e aumento do batimento opercular em *C. batrachus* (KUMAR et al., 2011); a cipermetrina altera o batimento opercular, o equilíbrio e o nado do *R. quelen* (BORGES et al., 2007); e *C. carpio* apresenta aumento do batimento opercular quando exposta ao fenvalerato (REDDY et al., 1992) e à cipermetrina (SUVETHA et al., 2010). Estas alterações indicam danos neurológicos e asfixia do animal.

Muitos estudos relatam os efeitos neurotóxicos de piretroides em peixes. Embora os resultados nem sempre sejam congruentes, eles apontam para uma possível inibição enzimática, assim como ocorre para organofosforados e carbamatos. O fenvalerato inibe a AChE em cérebro, brânquias, músculo e fígado da carpa indiana *Cirrhinus mrigala* (MUSHIGERI; DAVID, 2005) e de *C. carpio* (REDDY et al., 1992). Esta última, exposta à deltametrina, apresenta redução da atividade plasmática de AChE, sendo que cérebro, músculo e fígado não apresentam alteração; por outro lado, a deltametrina inibe a AChE cerebral *in vitro* (BÁLINT et al., 1995). Estes autores sugerem que a inibição *in vitro* da AChE cerebral por deltametrina seja resultado da interação do piretroide com o centro ativo da enzima ou alguma outra modificação na estrutura enzimática. Em *C. carpio*, Szegletes et al. (1995) relatam que há diferentes isoformas da AChE na espécie e sugerem que a deltametrina possa alterar a distribuição dessas isoformas de AChE mesmo sem alterar a sua atividade. *C. punctatus* exposta a concentrações subletais de  $\lambda$ -cialotrina e cipermetrina,

apresenta reduções significativas na atividade da AChE cerebral, muscular e branquial (KUMAR et al., 2009).

Para Houssain et al. (2004), os piretroides parecem ser capazes de modular a liberação de acetilcolina no hipocampo de ratos sem, contudo, alterar a atividade da AChE cerebral. A carpa *Tinca tinca* exposta por 60 dias a concentrações subletais de deltametrina não apresenta alteração da AChE cerebral (HERNÁNDEZ-MORENO et al., 2010), assim como o salmão *Oncorhynchus tshawytscha* exposto a concentrações subletais de fenvalerato (WHEELLOCK et al., 2005).

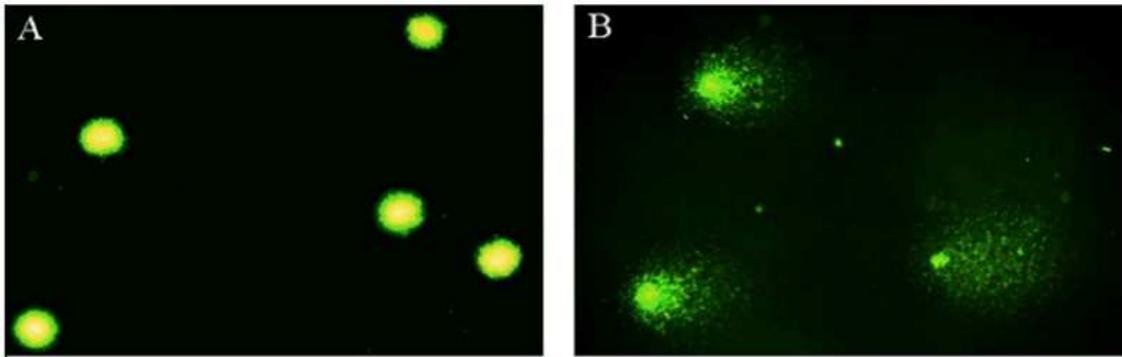
### *Genotoxicidade*

Apesar de ser um biomarcador bioquímico, as alterações no material genético de um organismo representam um impacto de alta ordem biológica, pois podem afetar todos os níveis de organização, desde o molecular até comunidade (SCHLENK et al., 2008). Quando as alterações ocorrem em células germinativas, o impacto ecológico é muito grande, pois este dano altera a qualidade e a quantidade da produção de gametas, refletindo assim na fertilidade e fecundidade do organismo. Quando as alterações ocorrem em células somáticas, os danos ao DNA podem provocar doenças potencialmente carcinogênicas e anormalidades morfológicas, que afetam o *fitness*, a adaptabilidade e a sobrevivência do animal (JHA, 2008).

Os danos ao DNA podem ser acessados de muitas formas, como pelas mutações, micronúcleos, aberrações cromossômicas e o teste do cometa. Este último, conhecido como eletroforese em gel de células individualizadas (*Single Cell Gel Assay*, SCG) ou simplesmente teste do cometa (*Comet Assay*), é um dos ensaios mais utilizados para revelar a genotoxicidade de um xenobiótico e o faz através da migração do DNA de células individuais (TICE et al., 2000; JHA, 2008).

Além de detectar quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis e lesões oxidativas, o teste do cometa permite avaliar alterações no sistema de reparo do DNA (TICE et al., 2000; GONTIJO; TICE, 2003). Esta técnica consiste na imersão de células eucarióticas em gel de agarose, lise da membrana celular por detergentes e sais alcalinos (pH>13) e posterior eletroforese (SINGH et al., 1988). Os núcleos com danos no DNA apresentam maior taxa de migração da molécula em direção ao ânodo, imitando a aparência de um cometa (Figura 16).

**Figura 16** - **A)** Nucleóides de hepatócitos de *Danio rerio* (controle). **B)** Nucleóides (ou “cometas”) de hepatócitos de *D. rerio* exposto *in vitro* à cipermetrina por 2 horas. Lâminas coradas com laranja de acridina e analisadas em microscópio de fluorescência.

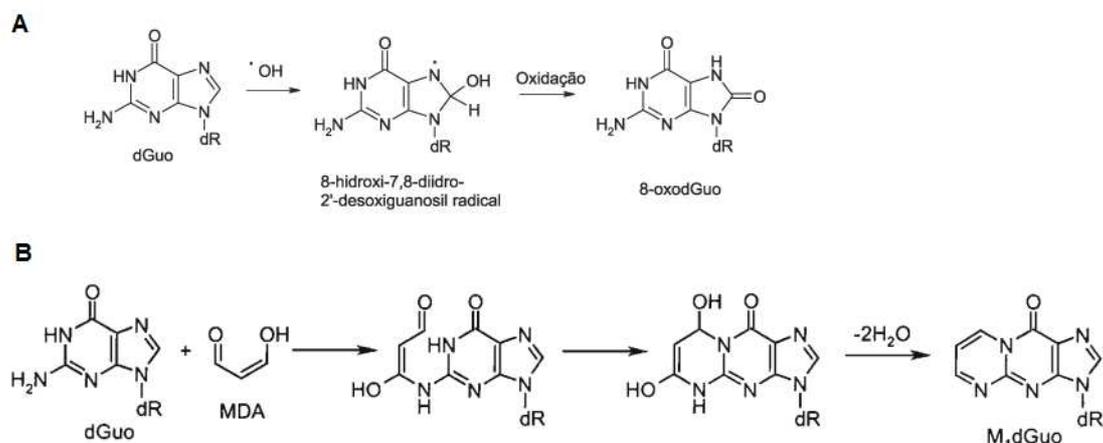


Fonte: JIN et al., 2011.

Comparado com outras técnicas para acessar a genotoxicidade, o teste do cometa tem muitas vantagens, como 1) sensibilidade para detectar baixos níveis de danos ao DNA, 2) requerimento de pouca quantidade de amostra biológica, 3) baixo custo, 4) fácil aplicação, 5) flexibilidade (qualquer tecido pode ser avaliado) e 6) período relativamente curto para a avaliação do material (poucos dias) (TICE et al., 2000).

As quebras de fitas do DNA podem estar diretamente associadas à presença de radicais livres na célula. As ERO podem oxidar as bases nitrogenadas das purinas e pirimidinas, levando a formação de quebra de fitas simples ou duplas (BERRA et al., 2006). O radical  $\bullet\text{OH}$ , por exemplo, pode ser adicionado na posição 8 da desoxiguanosina (dGuo), cujo produto final oxidado é a 8-oxodGuo. Além disso, os produtos da LPO são altamente reativos com o DNA, podendo gerar adutos, que são modificações covalentes no DNA que envolvem os sítios das bases, os quais estão envolvidos nas pontes de hidrogênio, que mantêm a estrutura de dupla hélice (CARVALHO, 2001) (Figura 17). Estes danos ao DNA podem ser detectados pelo teste do cometa (JHA, 2008).

**Figura 17 - A)** Reação de oxidação da desoxiguanosina (dGuo) com o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), formando a 8-oxodGuo. **B)** Reação do malonaldeído (MDA), produto da LPO, com a desoxiguanosina (dGuo), formando o aduto pirimidopurinoma ( $\text{M}_1\text{gGuo}$ ). dR= 2-deoxiribose.



Fonte: modificado de CARVALHO (2001); BERRA (2006).

Embora os piretroides sejam considerados pouco tóxicos aos mamíferos, a sua genotoxicidade é relatada em mamíferos (HUSSIEN et al., 2013) e em peixes, como ocorre para *C. punctatus* exposta à cipermetrina, que apresenta aumento na frequência de micronúcleos (MN) no sangue e aumento de aberrações cromossômicas em células renais (ANSARI et al., 2011). Hepatócitos de *D. rerio* exposto *in vitro* à cipermetrina por duas horas apresentam alterações no DNA, que foram evidenciadas pelo teste cometa, como aumento da frequência e intensidade da cauda dos cometas (JIN et al., 2011). A tilápia mossambica *Oreochromis mossambicus* apresenta aumento na frequência de MN em eritrócitos quando exposta à deltametrina, mesmo com uma dieta suplementada com vitamina E, um antioxidante não enzimático (KAN et al., 2012).

Os mecanismos de ação da cipermetrina que induzem à genotoxicidade ainda estão sendo estudados. Entende-se que o estresse oxidativo pode estar diretamente relacionado com os danos ao DNA, pois o aumento de ERO pode oxidar as bases nitrogenadas do DNA, comprometendo a sua estrutura (ANSARI et al., 2011; KAN et al., 2012; HUSSIEN et al., 2013). Além disso, a cipermetrina pode agir diretamente na molécula de DNA, visto a sua natureza hidrofóbica e o seu pequeno tamanho, podendo assim atravessar as membranas com facilidade e atingir o núcleo (SAXENA et al., 2005; HUSSIEN et al., 2013).

### 2.5.2.

### 2.5.3. Biomarcadores fisiológicos e piretroides

#### *Hematologia*

O sangue é um tecido de transporte e entra em contato direto com o contaminante e com diversos tecidos e órgãos, podendo assim refletir o estado fisiológico do animal (SUVETHA et al., 2010).

O sangue é o componente mais acessível do sistema de fluidos corpóreos de vertebrados e é muito utilizado para acessar o estado fisiológico do animal (HOUSTON, 1997). A capacidade de carrear oxigênio pode ser determinada por um ou mais variáveis hematológicas primárias (que são medidos diretamente), como o hematócrito (Ht), a concentração de hemoglobina total (Hb total) e o número de células vermelhas (*red blood cell count*, RBCC). A partir dessas variáveis, outros índices, chamados de secundários, podem ser calculados, como o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (HOUSTON, 1997; SCHLENK et al., 2008).

Os valores das variáveis hematológicas primárias são originalmente derivados de estudos com humanos, e um erro tem de ser considerado quando eles são utilizados para peixes, pois as células vermelhas de peixes possuem formato e flexibilidade de membrana diferentes e um perfil de células diferenciado, composto por células maduras, imaturas e senescentes (HOUSTON, 1997). O RBCC e a Hb total são os índices mais confiáveis para avaliar a capacidade de carrear oxigênio em peixes, sendo que o Ht é o parâmetro menos confiável, pois ele depende do volume celular, que pode variar durante a maturação (HOUSTON, 1997; SCHLENK, et al., 2008). Para Houston (1997), o parâmetro mais recomendado e com menor variação é o perfil eritron, que consiste na avaliação das células vermelhas em todos os estágios de seu desenvolvimento e a abundância relativa de cada estágio. Entretanto, muitos estudos sobre o efeito de poluentes em peixes têm abordado as variáveis hematológicas primárias e secundárias. Esses biomarcadores parecem sensíveis à contaminação ambiental e muitas inferências sobre a saúde e a capacidade de carrear oxigênio são relatadas, inclusive para peixes expostos a piretroides.

Os piretroides alteram as respostas hematológicas de peixes, como relatado para *Heteropneustes fossilis* que, quando exposto à deltametrina, apresenta quadro anêmico compensado por eritropoiese (KUMAR et al., 1999). Saxena e Seth (2002) relatam redução do Ht, RBCC e Hb total em *C. punctatus* exposta à cipermetrina. Aumento da Hb total é observado em *R. quelen* exposto à cipermetrina (BORGES et al., 2007). O cascudo *Ancistrus*

*multispinis* apresenta aumento do RBCC e da Hb total quando intoxicado por deltametrina (PIMPÃO et al., 2007). A carpa indiana *Catla catla* exposta à cipermetrina por 60 dias apresenta alteração hematológica indicativa de anemia, resultante de hemólise ou dano branquial (VANI et al., 2012).

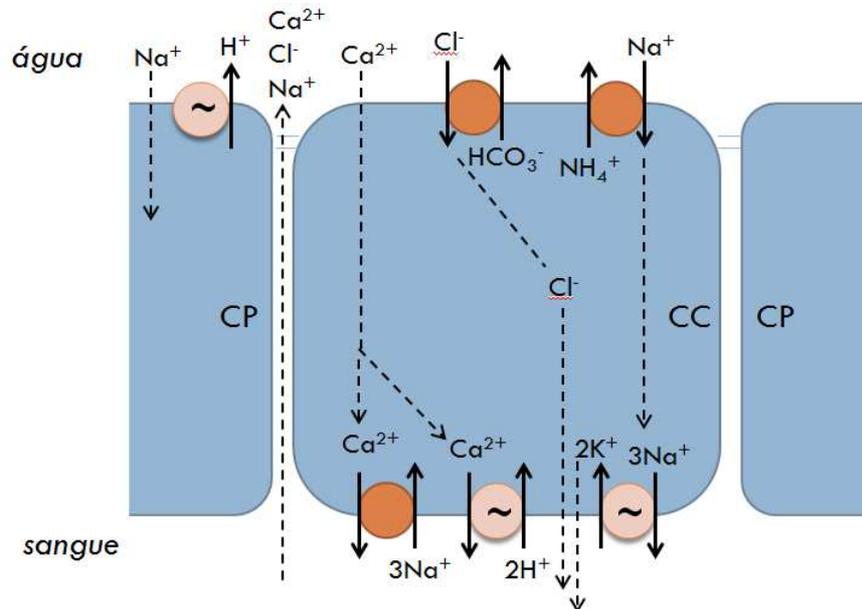
#### *Osmorregulação, íons e substratos metabólicos plasmáticos*

A estrutura e a função do epitélio branquial indica que, além das trocas gasosas, este também é um sítio de transporte iônico (EVANS et al., 2005). Em teleósteos de água doce, como a concentração celular de NaCl é hipertônica ao ambiente (~150mM versus ~1mM), esses animais têm uma tendência a super-hidratação (hipervolemia) e a depleção de sais (GREENWELL et al., 2003). Para compensar esse quadro, a entrada de íons e água dá-se pelas brânquias de forma unidirecional e o balanço iônico é atingido pelo controle da absorção de íons pelas brânquias, intestino, rim e pele. Além disso, o animal bebe pouca água e excreta grandes quantidades de urina diluída (GREENWELL et al., 2003; BONGA; LOCK, 2008).

As brânquias são órgãos importantes na regulação de água e íons em peixes expostos aos contaminantes. Como as principais rotas de entrada de agentes tóxicos (presentes na água ou na alimentação) dá-se por este tecido, o desajuste da regulação hidromineral ocorre com muita frequência em peixes expostos aos contaminantes ambientais (BONGA; LOCK, 2008).

As brânquias são os órgãos mais estudados quando se trata de regulação iônica e as células cloreto (CC) são as mais estudadas nas brânquias, pois são as células-chave no transporte de íons (BONGA; LOCK, 2008). Resumidamente, em teleósteos de água doce, a absorção de  $\text{Cl}^-$  está relacionada aos trocadores de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , presentes na porção apical das CC. A absorção de  $\text{Na}^+$  está relacionada os trocadores de  $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$ , presentes na porção apical das CC, e aos canais de  $\text{Na}^+$ , presentes na parte apical das células pavimentosas (CP), cujo influxo iônico é dirigido pelo gradiente eletroquímico regido por uma  $\text{H}^+$ -ATPase (PERRY, 1997; EVANS et al., 2005) Na porção basolateral das CC, a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase contribui para o influxo de  $\text{Na}^+$  no organismo do peixe (PERRY, 1997) (Figura 18).

**Figura 18** - Representação gráfica dos mecanismos osmorregulatórios do epitélio branquial de teleósteo de água doce. CC = célula cloreto; CP = célula pavimentosa; ~ indica ATPase. Transporte ativo e co-transporte são indicados por linhas sólidas; transporte passivo por linhas pontilhadas.



Fonte: modificado de BONGA; LOCK, 2008.

As CC têm um importante papel na regulação iônica de peixes, principalmente quando são expostos aos contaminantes ambientais (PERRY, 1997). Estas células possuem enzimas,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, que estão presas à membrana, mantêm o gradiente iônico e são capazes de se adaptar às mudanças celulares e estímulos fisiológicos (SUNNY; OOMMEN, 2001).

Muitos contaminantes orgânicos e inorgânicos podem alterar a permeabilidade do epitélio branquial à água e íons por meio 1) da ação direta do contaminante sobre os mecanismos de transporte de íons e água e/ou 2) da ação indireta, através da indução de respostas clássicas de estresse, que envolvem a liberação de catecolaminas e cortisol na corrente sanguínea (PICKERING; POTTINGER, 1995; BONGA; LOCK, 2008). Em teleósteos de água doce, o rápido aumento de catecolaminas na corrente sanguínea, provoca um aumento na perfusão lamelar e da permeabilidade de íons pelas brânquias. Consequentemente, uma série de alterações lideradas pela liberação de cortisol, como a proliferação de CC, pode ocorrer para compensar a permeabilidade aumentada de íons e água (PERRY, 1997; BONGA; LOCK, 2008). A proliferação de CC, estimulada por cortisol,

objetiva o restabelecimento do balanço iônico, visto que o epitélio branquial eleva a sua capacidade para a absorção de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (PERRY, 1997; EVANS et al., 2005). Entretanto, a proliferação de CC pode provocar um aumento na espessura da membrana lamelar (barreira água-sangue) e prejudicar as trocas gasosas nas brânquias, já que a distância de difusão fica aumentada (PERRY, 1997).

O cortisol pode aumentar a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas brânquias, no intestino e no rim (SUNNY; OOMMEN, 2001; BONGA; LOCK, 2008) e o influxo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$  pelas CC (PERRY, 1997). Assim como ocorre para as CC, as  $\text{H}^+$ -ATPases das células pavimentosas são sensíveis ao cortisol, sendo que o aumento de cortisol pode estimular o influxo de  $\text{Na}^+$  para dentro da célula (LIN; RANDALL, 1993).

Os piretroides podem provocar desordens osmorregulatórias, as quais são consideradas mecanismos secundários (ou adicionais) da toxicidade em peixes (COATS, 2008). Alguns estudos relatam que, além da interferência na atividade de  $\text{Ca}^+$  ATPases (COATS, 2008), os piretroides também alteram a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e a concentração dos íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ) em peixes (BORGES et al., 2007; SUVETHA et al., 2010; AL-GHANBOUSI et al., 2012). Redução na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático é relatada para o bagre *Heteropneustes fossilis* exposta à cipermetrina (MISHRA et al., 2005). Em *L. rohita*, o fenvalerato desajusta a osmorregulação de tal forma que muitos tecidos apresentam redução significativa de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  (REDDY; PHILIP, 1992). Além disso, proliferação de CC é observada em *Aphanius dispar* exposta a deltametrina, acompanhada de alteração do balanço iônico e de redução da área de contato para as trocas gasosas (AL-GHANBOUSI et al., 2012).

No plasma, além da quantificação de íons, a mensuração de metabólitos e enzimas são biomarcadores muitos utilizados em peixes expostos aos contaminantes ambientais. Para Scott e Sloman (2004) as alterações no metabolismo de peixes, decorrentes da exposição à xenobióticos, podem ser verificadas através das alterações nas concentrações de substratos metabólicos, como glicose, glicogênio, lactato, lipídeos, proteínas, entre outros. Uma das respostas secundárias de estresse mais estudadas é a elevação da concentração de glicose plasmática, que ocorre em muitas condições estressoras como captura, manuseio e exposição a poluentes. O aumento de glicose plasmática pode ser resultante da baixa utilização de glicose pelo organismo ou da estimulação da gliconeogênese e/ou da glicogenólise, via liberação de cortisol, e tem a função de oferecer energia ao animal enfrentar a condição adversa (BARTON; IWAMA, 1991; PICKERING; POTTINGER, 1995).

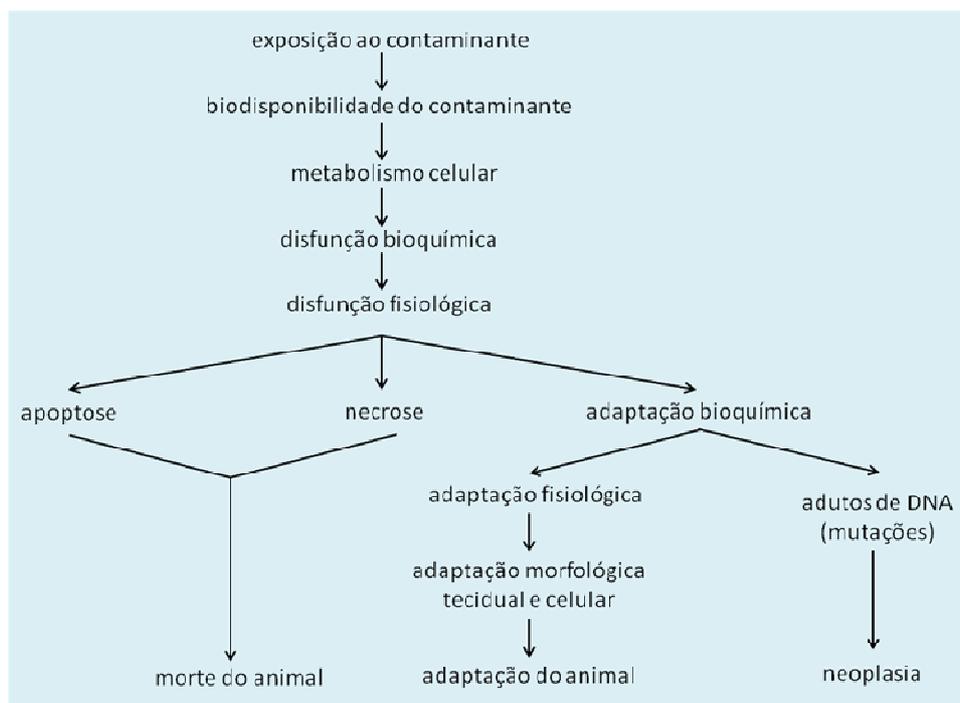
### 2.5.4. Biomarcadores patológicos e piretroides

#### *Histopatologia*

A exposição subletal aos contaminantes ambientais pode resultar em mudanças histológicas e patologias, as quais podem afetar a função de tecidos e órgãos. O uso de técnicas histopatológicas é vantajoso, pois permite ao pesquisador avaliar os órgãos-alvos e, mais especificamente, as células que foram afetadas pela exposição (SCHLENK et al., 2008).

A histopatologia é um biomarcador de alterações que ocorreram em um grau de organização biológica mais elevado e que tem, portanto, maior relevância ecológica do que os biomarcadores bioquímicos e fisiológicos. A histopatologia pode complementar os resultados referentes às respostas bioquímicas em peixes expostos aos estressores ambientais, principalmente em concentrações subletais (SCHWAIGER, 1997; BERNET et al., 1999). Em casos extremos, se as alterações bioquímicas e fisiológicas decorrentes da contaminação não forem revertidas, a toxicidade e morte celular podem ser detectadas pela necrose tecidual e apoptose (SCHLENK et al., 2008). Basicamente, diante da disfunção bioquímica e fisiológica, quatro respostas histopatológicas podem ser observadas: 1) apoptose e 2) necrose, que conduzem o animal à morte, 3) adaptações morfológicas das células e do tecido, que promovem a adaptação do animal à condição adversa, e a 4) neoplasia, que ocorre após a formação de mutações no DNA (Figura 19).

**Figura 19** - Alterações histopatológicas resultante das alterações bioquímicas e fisiológicas.

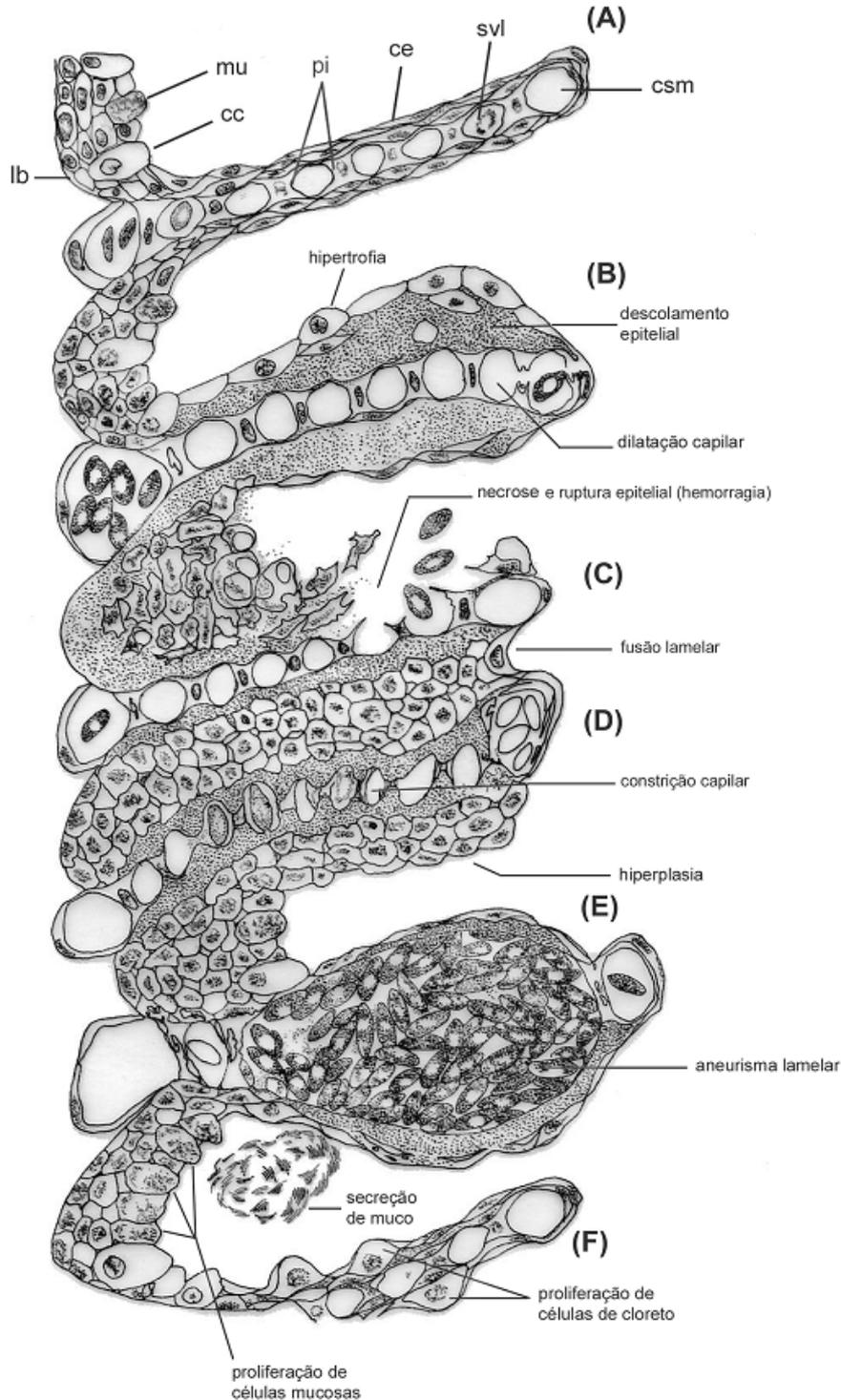


Fonte: modificado e traduzido de SCHLENK et al., 2008.

As brânquias apresentam grande relevância nos estudos histopatológicos, pois são órgãos envolvidos em múltiplas funções como, trocas gasosas, osmorregulação, regulação ácido-base e excreção de compostos nitrogenados (EVANS et al., 2005), e que entram em contato direto com o estressor químico. Muitas alterações morfológicas podem ser observadas em brânquias de peixes expostos aos contaminantes ambientais, como hipertrofia, hiperplasia, descolamento epitelial, dilatação dos vasos sanguíneos, necrose e ruptura epitelial (hemorragia), fusão lamelar, aneurismas, proliferação de células cloreto, proliferação de células mucosas e hipersecreção de muco (MACHADO, 1999) (Figura 20).

Os piretroides provocam alterações histopatológicas em brânquias de peixes, como relatado para *C. mrigala* exposta à  $\lambda$ -cialotrina (VELMURUGAN et al., 2007) e para *O. niloticus* exposta à cipermetrina (KORKMAZ et al., 2009), os quais apresentam aneurismas na lamela secundária, hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar, fusão lamelar e necrose após a exposição. A *C. carpio* exposta à ciflutrina apresenta aneurismas na lamela secundária e hiperplasia do epitélio branquial (SEPICI-DINÇEL et al., 2009). Dilatação dos vasos sanguíneos e aneurismas são relatados para *A. dispar* exposto à deltametrina (AL-GHANBOUSI et al., 2012); hiperplasia do epitélio branquial, descolamento do epitélio e fusão lamelar são relatados para tilápia *O. niloticus* após a exposição à deltametrina (KAN et al., 2012).

**Figura 20** - Diagrama esquemático das lesões branquiais mais comuns. (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; cc = célula-cloreto; mu = célula mucosa; pi = célula pilar; ce = célula epitelial lamelar; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sanguíneo marginal.



Fonte: MACHADO (1999); MALLAT (1985).

## 2.6. A espécie de estudo

Os peixes constituem um grupo relevante de organismos-teste para avaliar os efeitos de xenobióticos. Isto se deve ao fato destes animais apresentarem um amplo espectro de comportamentos e hábitos que aumentam o seu potencial para a avaliação dos efeitos de produtos químicos em diferentes matrizes ambientais, como produtos químicos adsorvidos, dissolvidos, em suspensão ou depositados na água e no solo (RAND, 1995).

A espécie escolhida para este estudo foi a *Brycon amazonicus* (SPIX; AGASSIZ, 1829), comumente chamada de matrinxã (Figura 21) e com a seguinte posição taxonômica:

CLASSE – Osteichthyes

SUBCLASSE – Actinopterygii

INFRACLASSE – Teleostei

SUPERORDEM – Osthariophysii

ORDEM – Characiformes

FAMÍLIA – Characidae

GÊNERO – *Brycon*

ESPÉCIE – *Brycon amazonicus*

**Figura 21** - Matrinxã *Brycon amazonicus* (SPIX; AGASSIZ 1829).



Fonte: a autora.

O valor econômico do matrinxã está relacionado à rápida e crescente criação desta espécie na Amazônia, perdendo apenas para a demanda de tambaqui. De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), em

2005 foram produzidas mais de 1500 toneladas de matrinxã em sistema de aquicultura continental no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2007). Além da qualidade da carne, sabor agradável e crescimento rápido, a agressividade da espécie despertou interesse pela criação do matrinxã no Estado de São Paulo (GOMES; URBINATI, 2005; ZANIBONI-FILHO et al., 2006). A escolha da espécie para este estudo dá-se também pelas exigências do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (1987), o qual recomenda a utilização de espécies pertencentes à família Characidae, na ausência de espécies padronizadas para testes toxicológicos.

# **3. Justificativa e Objetivo**

A contaminação de ambientes aquáticos por inseticidas piretroides, os efeitos adversos causados por esta ocorrência, a falta de legislação nacional específica para piretroides na água e a importância da criação de matrinxã *Brycon amazonicus* no Brasil, justificam o estudo das respostas bioquímico-fisiológicas de *B. amazonicus* exposto à cipermetrina, na formulação Galgotrin®. O objetivo deste estudo foi investigar biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e patológicos de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin® por 96 horas, em duas condições experimentais: exposição aguda e subletal. Para atingir este objetivo, algumas estratégias foram adotadas, tais como:

- a. Estimativa da Concentração-Letal para 50% da população de *B. amazonicus* por 96 horas (CL50;96h) de cipermetrina, na formulação Galgotrin®, e avaliação dos sinais de intoxicação;
- b. Avaliação dos efeitos de 20% da CL50;96h desse inseticida sobre o sistema de defesa antioxidante enzimático, não enzimático e peroxidação lipídica de *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição;
- c. Avaliação dos efeitos de 20% da CL50;96h desse inseticida sobre as variáveis osmorregulatórias (íons e enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>/ATPase branquial) de *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição;
- d. Avaliação dos efeitos de 20% da CL50;96h desse inseticida sobre as variáveis hematológicas e plasmáticas de *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição;
- e. Avaliação dos efeitos de 20% da CL50;96h desse inseticida sobre a morfologia de brânquias em *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição;
- f. Avaliação dos efeitos neurotóxicos de 20% da CL50;96h desse inseticida em *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição. Avaliação *in vitro* dos efeitos neurotóxicos de concentrações subletais de cipermetrina em *B. amazonicus*.
- g. Avaliação dos efeitos genotóxicos de 20%, 40% e 60% da CL50;96h desse inseticida em *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição.

A escolha da cipermetrina baseou-se no fato deste inseticida ser 1) utilizado em pisciculturas no combate à ectoparasitos (legalmente, em outros países e de forma não regulamentada no Brasil), 2) entrar em contato com a água indiretamente, pelos meios agrícolas e domissanitários e 3) ser o piretroide com maior número de registros comerciais no Brasil, segundo o MAPA (BRASIL, 2013). As concentrações de cipermetrina que foram investigadas são ambientalmente relevantes (MARINO; RONCO, 2005; BELLUTA et al., 2010) e próximas daquelas utilizadas em piscicultura (HART et al, 1997; HAYA, 2005).

A espécie estudada é responsiva à contaminação ambiental, pertencente à família Characidae e é de amplo interesse comercial devido à qualidade da carne e seu potencial para a aquicultura. Os biomarcadores escolhidos foram responsivos à contaminação ambiental, são amplamente estudados em toxicologia aquática e forneceram dados sobre a adaptabilidade e os prejuízos da espécie frente à exposição ao piretroide. Este estudo assentou-se na hipótese de que tais biomarcadores responderiam ao estressor químico, revelando a plasticidade bioquímico-fisiológica do animal ou os danos decorrentes da exposição subletal. Os resultados encontrados indicaram que, na maioria dos casos, a hipótese foi aceita, visto as alterações das respostas biológicas, que são apresentadas e discutidas nas seções 5 e 6.

# **4. Material e Métodos**

---

#### 4.1 Comitê de ética

As condições experimentais e os procedimentos deste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para Uso Animal, da Universidade Federal de São Carlos, sob o protocolo CEUA 056/2011.

#### 4.2 Reagentes e inseticida

Neste trabalho, foi utilizada a formulação comercial do inseticida piretroide Galgotrin<sup>®</sup>, cedido pela Milênia Agrociências S.A. (Londrina, PR, Brasil), cujo princípio ativo é a cipermetrina (250 g L<sup>-1</sup>). Todos os reagentes utilizados nas análises laboratoriais são de procedência da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), Merck (Darmstadt, Alemanha) e Singh (São Paulo, Brasil).

As formulações de inseticidas comerciais possuem em suas composições solventes orgânicos, nem sempre identificados pelas empresas fabricantes e, muitas vezes, que são ditos inertes. Como a utilização da cipermetrina na aquicultura, na agricultura e no combate aos insetos domésticos e de vetores de doenças dá-se pelas formulações comerciais, avaliamos a cipermetrina em uma de suas formulações comerciais.

O Galgotrin<sup>®</sup> é inserido na classificação toxicológica conhecida como grupo I (extremamente tóxico) e na classificação ambiental do grupo II (produto muito perigoso ao meio ambiente). A ficha técnica do Galgotrin<sup>®</sup> concedida pela empresa fabricante não apresenta a composição do seu solvente. O relatório fornecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) indica que a fórmula Galgotrin<sup>®</sup>, sob o registro 378907, é composta por 70% de ingredientes inertes (BRASIL, 2013). A Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB) disponibiliza uma bula deste inseticida, na qual o xileno e outros ingredientes aparecem como solventes (PARANÁ, 2013). Dessa forma, não se descarta a hipótese de que os efeitos destes solventes (muitas vezes chamados de ingredientes inertes) possam estar inclusos entre os observados neste estudo, embora o único princípio dito ativo na formulação, substância quimicamente ativa responsável pela ação do medicamento representado pelo seu nome genérico (DESTRUTI, 1999), seja apenas a cipermetrina.

### 4.3 Qualidade da água

#### *Temperatura, oxigênio dissolvido e pH*

A temperatura e o oxigênio dissolvido eram determinados eletrometricamente (Dissolved Oxygen YSI 55) nos tanques. O pH era medido nas amostras de água com um pHmetro Orion 710.

#### *Amônia*

A concentração de amônia era determinada pelo método de Gentzkow e Masen (1942), modificado. Em 2 mL de amostra de água era adicionado 0,5 mL de reativo Nessler. Após 30 minutos, era feita a leitura em 420nm em um espectrofotômetro HACH modelo DR2010. A concentração de amônia era estimada contra um padrão de amônia de 50 nmol.

#### *Dureza*

A dureza da água foi determinada segundo American Public Health Association (1980). À amostra de água era adicionado o indicador Ericromo negro T e então, era realizada a titulação com EDTA até o ponto de viragem da cor rosa para a azul. O cálculo da dureza, em mg de  $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , seguiu a seguinte fórmula:

$$\text{Dureza} = (\text{mL de EDTA}) \times [(0,01) \times (100,1) \times (1000)] / \text{volume da amostra}$$

#### *Alcalinidade*

A alcalinidade da água foi determinada segundo Goldstein e Clymo (1969). O pH da amostra de água era verificado e, posteriormente, a amostra era titulada com ácido sulfúrico 0,01N até o pH 4,0. Para o cálculo da alcalinidade, em  $\text{mg L}^{-1}$  de carbonatos e bicarbonatos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Alcalinidade} = (\text{mL de H}_2\text{SO}_4) \times [(0,01 \times 50\ 000)] / \text{volume da amostra}$$

### 4.4 Aclimação dos animais

Para a realização deste trabalho, foram utilizados juvenis de *Brycon amazonicus* (Teleostei: Characidae) gentilmente cedidos pela piscicultura Polettini (Mogi-Mirim, SP, Brasil) e pelo Centro de Aquicultura da Unesp (CA-Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil). Os peixes permaneceram em tanques de 2000 L e foram monitorados por quatro semanas em um

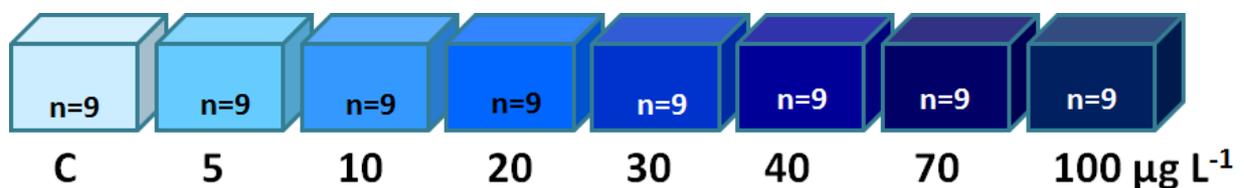
sistema aberto de recirculação de água, com aeração constante, onde a temperatura, o pH, o oxigênio dissolvido, a alcalinidade e a dureza foram controlados e mantidos dentro de limites aceitáveis para a criação desta espécie. Os peixes foram alimentados até a saciedade, duas vezes ao dia, com ração comercial contendo 36% de proteína bruta.

#### 4.5 EXPERIMENTO I: Teste de toxicidade aguda (CL50;96h) e sinais de intoxicação

Para o teste de toxicidade aguda, foram ensaiadas sete concentrações do ingrediente ativo cipermetrina e o controle. Após o período de aclimação, 72 peixes (30,5 g e 12,5 cm) foram transferidos e divididos em oito tanques de 250 L (Figura 22). A densidade foi mantida próximo de  $1 \text{ g L}^{-1}$  (INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 1987; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1992). Este experimento apresentou um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com um  $n=9$  para cada condição experimental.

Os animais foram aclimatados e alimentados diariamente neste novo sistema por uma semana. A alimentação foi suspensa 24 h antes do início até o final deste experimento. As concentrações testadas foram: 0 (controle), 5, 10, 20, 30, 40, 70 e  $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de i.a (ingrediente ativo).

**Figura 22** - Concentrações nominais ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) do ingrediente ativo cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, para o teste de toxicidade aguda (CL50) por 96 horas,  $n=9$  para cada condição experimental C = controle, sem inseticida.



Fonte: Elaborado pela autora.

O teste de toxicidade aguda foi realizado em um sistema estático e a qualidade da água (aeração constante, temperatura, pH, oxigênio dissolvido, alcalinidade e dureza) foi monitorada diariamente, segundo Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011) (Tabela

1). O experimento ocorreu por 96 horas. A mortalidade dos peixes foi registrada a cada 24 h. Para o cálculo da CL50, foi utilizado o software “Trimmed Spearman-Kärber” “LC50 Programs JSPEAR” (HAMILTON et al., 1977), com 95% de confiança ( $P < 0,05$ ).

Durante o teste de toxicidade aguda, alguns sinais de intoxicação dos animais foi observado em todas as concentrações. Os padrões avaliados foram: movimento opercular, alterações da natação, cor e equilíbrio.

**Tabela 1** - Qualidade da água do experimento I: teste de toxicidade aguda. Média e desvio padrão para o total de coletas de água (n=4).

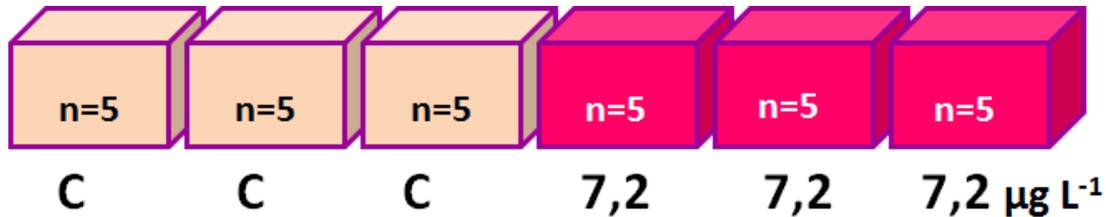
| <b>Experimento I</b>  | <b>Controle</b> | <b>Expostos</b> |
|---|-----------------|-----------------|
| Temperatura (°C)  | 25,5±0,5        | 25,2±0,3        |
| Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )                                      | 5,7±0,4         | 6,01±0,3        |
| Dureza (mg de CaCO <sub>3</sub> )                                   | 18±0,1          | 18±0,1          |
| Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> de HCO <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) | 28,5±0,3        | 24,5±0,5        |
| pH  | 7,4±0,3         | 7,3±0,4         |

Fonte: Elaborado pela a autora.

#### **4.6 EXPERIMENTO II: Exposição subletal ao Galgotrin<sup>®</sup> por 96 horas**

Trinta peixes (controle: 46±15 g e 15±2 cm; expostos: 45±12 g e 15±1,5 cm) foram igualmente divididos em seis tanques de amianto de 250 L. Este experimento foi realizado em DIC, com um  $n=15$  para cada condição experimental (Figura 23). O experimento ocorreu em triplicata, sendo que três tanques receberam 7,2 µg L<sup>-1</sup> (20% da CL50;96h) do ingrediente ativo e três tanques foram mantidos livres de xenobiótico, sendo denominados tanques-controle. Esta concentração foi escolhida por ser próxima à concentração de 5 µg L<sup>-1</sup>, recomendada em pisciculturas (HART et al., 1997; SEPA, 1998; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2003; HAYA, 2005)

**Figura 23** - Representação gráfica do segundo experimento da exposição subletal ao Galgotrin<sup>®</sup>,  $n=15$  para cada condição experimental ( $n=5$  por caixa). C = controle, sem inseticida; concentração nominal de cipermetrina em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pela a autora.

Os animais foram aclimatados e alimentados diariamente neste novo sistema por uma semana. A alimentação foi suspensa 24 h antes do início até o final do experimento.

A exposição subletal ao Galgotrin<sup>®</sup> ocorreu em um sistema estático, com aeração constante e a qualidade da água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido, amônia, dureza e alcalinidade) foi monitorada diariamente segundo Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011) (Tabela 2).

Após 96 h de exposição, os peixes foram amostrados. Os animais foram anestesiados por imersão em eugenol 1:20 (em etanol) (INOUE et al., 2003) e o sangue foi coletado por punção caudal com seringas heparinizadas. Logo após, os peixes foram abatidos por secção medular e foi realizada a biometria. Uma porção de sangue foi utilizada para a avaliação das variáveis hematológicas e outra porção foi centrifugada a  $13\ 400 \times g$  por 3 minutos, para obtenção de plasma. Músculo branco, fígado, brânquias, cérebro e rim foram rapidamente retirados e congelados em nitrogênio líquido. Os tecidos e o plasma foram estocados a  $-80\ ^\circ\text{C}$  para as análises bioquímicas.

**Tabela 2** - Qualidade da água no experimento II: exposição subletal a  $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (20 % da CL50;96h) de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Média e desvio padrão para o total de coletas de água (n=4).

| <b>Experimento II</b>   | <b>Controle</b> | <b>20%</b> |
|---|-----------------|------------|
| Temperatura (°C)  | 25,6±0,4        | 25±0,5     |
| Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )                                      | 5,74±0,06       | 5,95 ±0,15 |
| Amônia (mg L <sup>-1</sup> )  | 0,59±0,15       | 0,85±0,2   |
| Dureza (mg de CaCO <sub>3</sub> )                                   | 19,6±1,2        | 19,6±2,8   |
| Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> de HCO <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) | 25,2±2,2        | 21,6±3,7   |
| pH  | 7,4±0,04        | 7,2±0,1    |

Fonte: Elaborado pela a autora.

#### 4.6.1 Balanço redox

##### *Peroxidação lipídica tecidual - LPO*

O nível de peroxidação lipídica foi quantificado em fígado e brânquias pela oxidação do Fe<sup>2+</sup> na presença de xilenol laranja, conhecido como ensaio FOX - Ferrous Oxidation/ Xylenol - (JIANG et al., 1992).

Uma porção de tecido foi homogeneizada em tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M pH7,0/sacarose 0.25M na proporção de 1:2, em homogeneizador (Turax<sup>®</sup> T10, Ika) sob velocidade média. Os homogeneizados eram centrifugados a  $15000 \times g$  por 10 min a 4 °C. Ao sobrenadante eram misturados 100 µL de TCA 12%; esta mistura era centrifugada a  $5000 \times g$  por 10 min a 4 °C. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante era utilizada para a quantificação de LPO.

Ao sobrenadante eram adicionados 900 µL da seguinte mistura de reação: 0,1 mM de xilenol laranja, 4 mM butilhidroxitolueno (BHT), 25 mM de ácido sulfúrico, 0,25 mM de FeNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> em metanol 90%. Esta mistura era incubada no escuro por 30 min. A concentração de hidroperóxidos era então detectada pela densidade ótica a 560 nm, contra um padrão de 100 nmol de hidroperóxido de cumeno (CHP). A concentração foi expressa em µmol de CHP por grama de tecido.

*Antioxidantes enzimáticos*

Todas as enzimas antioxidantes foram determinadas segundo o método proposto por Beutler (1984).

*Preparação dos homogeneizados teciduais*

Uma porção de fígado, rim e brânquias era homogeneizada em tampão contendo fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 e sacarose 0,25 M, na proporção 1:2. As amostras eram homogeneizadas em banho de gelo, com homogeneizador (Turrax<sup>®</sup> T10, Ika) em velocidade média. Posteriormente, as amostras eram centrifugadas por 10 minutos a  $15000 \times g$  a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas.

*Superóxido dismutase total – SOD*

A atividade da SOD foi ensaiada em fígado. Não foi possível detectar a atividade da SOD em brânquias e rim. O ensaio consiste na auto-oxidação do pirogalol, que é inibido na presença da SOD. A determinação da superóxido dismutase foi feita em cubeta de 3 mL, à qual eram adicionados 200  $\mu$ L de Tris HCl-EDTA 1 M, pH 7,5, e 0,4 mg de proteína do sobrenadante, completando-se o volume para 1960  $\mu$ L com água destilada. As amostras eram pré-incubadas a 25 °C por 2 minutos. Posteriormente, eram adicionados 40  $\mu$ L de pirogalol 10 mM em HCl 10 mM. A variação da densidade óptica era determinada em 420 nm, em reações cinéticas de 2 minutos com registro a cada 15 segundos. A atividade da SOD era determinada sabendo-se que uma unidade de SOD (UI) inibe 50 % da auto-oxidação do pirogalol.

*Catalase – CAT*

A atividade da catalase foi estimada em sobrenadante de fígado, brânquias e rim, pelo decaimento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em 230nm. Ao sobrenadante foram adicionados 20  $\mu$ L de etanol a 95% para impedir a reversão da atividade enzimática. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era determinada na hora do uso. Para isso, em uma cubeta de 3 mL era adicionado 1,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 e a leitura óptica era feita em 230 nm. Esta primeira leitura foi chamada de DO1. Após esta leitura, eram adicionados à mesma cubeta 200  $\mu$ L da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estoque, diluído 100 vezes, e uma nova leitura óptica era realizada, sendo chamada de DO2. O cálculo para quantificar a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi baseado na subtração de DO1 de DO2, multiplicando-se posteriormente por 141, dado que  $\epsilon$  da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é  $0,071 \text{ (mM.cm)}^{-1}$  e o volume final na reação era de 2 mL, como segue:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = (\text{DO2} - \text{DO1}) \times 141$$

A atividade da catalase era determinada adicionando-se, à cubeta de 3 mL: 100 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; 900 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM e água destilada para completar 1950 µL. A mistura era incubada por 2 minutos com um volume apropriado de sobrenadante (0,4 mg de proteína) e a atividade de reação era registrada a cada 10 segundos, em 230 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 0,071(mM.cm)<sup>-1</sup>. Uma unidade (UI) de CAT é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto.

#### *Glutathione peroxidase – GPx*

A atividade de glutathione peroxidase foi determinada em fígado, brânquias e rim. O ensaio consiste na extinção do NADPH+H<sup>+</sup>, pela glutathione redutase (enzima acessória) em 340 nm. Para a determinação enzimática eram adicionados à cubeta de 1mL: 100 µL de Tris-EDTA 1 M pH 8,0; 20 µL GSH 0,1 M; 100 µL de glutathione redutase 10 U/mL; 100 µL de NADPH+H<sup>+</sup> 2 mM; 380 µL de azida sódica 2,6 µM; 0,1 mg de proteína do sobrenadante e água destilada para completar 970 µL. Esta amostra era pré-incubada por 2 minutos. Após este passo, eram adicionados 30 µL de t-butilhidroperóxido 7 mM. O decréscimo da densidade óptica era determinado contra um branco a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi 6,20 (mM.cm)<sup>-1</sup>. Uma unidade (UI) de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1,0 µmol of NADPH+H<sup>+</sup> por minuto.

#### *Glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PDH*

A glicose-6-fosfato desidrogenase foi ensaiada em sobrenadante de fígado, brânquias e rim. O ensaio se baseou na redução monitorada do NADP<sup>+</sup> em 340 nm. A mistura de reação continha 880 µL do coquetel de reação que consistia de: HCl 0,1 M pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 0,01 M e NADP<sup>+</sup> 0,2 mM. A este coquetel eram adicionados 0,1 mg de proteína do sobrenadante e água destilada para um volume final de 950 µL. A reação era iniciada pela adição de 50 µL de glicose-6-fosfato 0,1 M. A redução de NADP<sup>+</sup> era determinada por 2 minutos, com registros a cada 15 segundos, em 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 6,20 (mM.cm)<sup>-1</sup>. Uma unidade de enzima (UI) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 µmol de NADPH+H<sup>+</sup> por minuto.

*Antioxidantes não enzimáticos**Ácido ascórbico*

A concentração de ácido ascórbico foi determinada colorimetricamente em fígado, brânquias, rim e cérebro, em 524 nm (CARR et al., 1983). Os extratos dos tecidos eram homogeneizados em TCA 5% (ácido tricloroacético) na razão de 1:40 (brânquias) ou 1:20 (demais tecidos), em homogeneizador (Turrax<sup>®</sup> T10, Ika) na velocidade intermediária. Posteriormente, os homogeneizados eram centrifugados por 3 minutos a  $13400 \times g$  e os sobrenadantes utilizados na quantificação. A mistura de reação consistia de: 250  $\mu$ L de água destilada, 400  $\mu$ L de sobrenadante e 25  $\mu$ L de 2,6-diclorofenolindofenol a 0,2 %. Esta mistura reagia por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente eram adicionados 250  $\mu$ L do reagente de tiouréia 0,2 % dissolvido em ácido metafosfórico 5 % e 250  $\mu$ L de dinitrofenilhidrazina 0,2 % dissolvido em ácido sulfúrico 12 M. Esta mistura era incubada a 60 °C por 3 horas. Após este período, eram adicionados 500  $\mu$ L de ácido sulfúrico 18 M resfriado; as amostras eram então centrifugadas a  $500 \times g$  por 10 minutos. Os tubos eram resfriados em gelo e a leitura óptica era realizada contra um padrão de 100 nmol de ácido ascórbico em 524 nm. A concentração de ácido ascórbico foi expressa em  $\mu$ mol por grama de tecido.

*Glutathione - GSH*

A concentração de GSH foi determinada colorimetricamente em fígado e brânquias, a 421 nm (BEUTLER, 1984). O método utilizado baseia-se na reação entre GSH e DTNB, com formação de TNB, um produto de cor amarelada.

Porções de tecidos eram homogeneizadas em tampão de fosfato de sódio 0,2M pH 7, em banho de gelo, na razão de 1:20, em homogeneizador (Turrax<sup>®</sup> T10, Ika) na velocidade intermediária. Em seguida, os homogeneizados eram centrifugados a  $13\ 400 \times g$  por 3 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de GSH.

Em 500  $\mu$ L de sobrenadante eram adicionados 750  $\mu$ L de reagente de precipitação (1,67 g de ácido metafosfórico, 0,2 g EDTA, 30g de NaCl para 100 mL de água destilada). Esta mistura era centrifugada a  $13\ 400 \times g$  por 3 min, e dela eram retirados outros 500  $\mu$ L do sobrenadante, nos quais eram adicionados 2000  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8 e 250  $\mu$ l de DTNB (ácido 5,5` - ditiobis - 2- nitrobenzóico, 2,5 mM). Esta mistura ficava

incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período, era feita a leitura óptica da formação do ânion tiolato em 412 nm, contra um padrão de 100 nmol de GSH.

#### 4.6.2 Balanço iônico e variáveis hematológicas

##### *Quantificação de Sódio ( $\text{Na}^+$ ) e Potássio ( $\text{K}^+$ )*

As concentrações totais de sódio e potássio plasmáticos foram determinadas em fotômetro de chama Digimed, modelo DM-61. A solução padrão era composta por 140 mEq de  $\text{Na}^+$  e 5,0 mEq de  $\text{K}^+$  (ref. DM-S 13A). As amostras de plasma eram previamente diluídas em água destilada na proporção de 1:100.

##### *Quantificação de Cloreto ( $\text{Cl}^-$ )*

As concentrações de cloreto foram determinadas colorimetricamente a 480 nm segundo American Public Health Association (1980) em plasma previamente diluído em água destilada na proporção de 1:100. Esse método utiliza como reagentes as soluções de tiocianato de mercúrio 0,09% em etanol P.A. (reagente A) e nitrato de ferro monohidratado 6% em ácido nítrico 0,4 M (reagente B), em uma relação de 3A:10B. Uma curva padrão de NaCl 1,0 mM foi usada como referência.

##### *Proteína total nos homogeneizados teciduais e plasma*

Para a determinação de proteína total, uma alíquota de 10 $\mu\text{L}$  da amostra, homogeneizada em água, mais 190 $\mu\text{L}$  do reagente Bradford (KRUGER, 1994) eram transferidos para um poço de uma microplaca. Depois de incubados à temperatura ambiente, no escuro, por 10 minutos, era feita a leitura óptica em 620 nm, em um leitor de microplacas (Termo max<sup>®</sup>, Molecular Devices). As amostras eram lidas contra um padrão de 0,125 mg de albumina  $\text{mL}^{-1}$ .

##### *Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase*

A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi ensaiada em brânquias. Após lavados em solução salina, alguns filamentos branquiais foram separados dos arcos e congelados a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , em tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol) pH 7,4. Os filamentos branquiais foram

homogeneizados e centrifugados a  $10\,000 \times g$  por 5 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi determinada pelo método descrito por Quabius et al. (1997) e adaptado para leitora de microplacas. A leitura óptica foi feita em 620 nm e a atividade da enzima expressa em  $\mu\text{M Pi/mg proteína/h}$ .

### *Glicose*

Para a determinação de glicose foi utilizado o Kit LabTest. Uma alíquota de  $10\mu\text{L}$  da amostra, homogeneizada em água, mais  $190\mu\text{L}$  do reagente fornecido pelo Kit foram pipetados em microplaca. Depois de incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 525nm através de um espectrofotômetro leitor de microplacas (Termomax®, Molecular Devices). O padrão de glicose utilizado foi de  $100\text{ mg dL}^{-1}$ .

### *Microhematócrito (Ht)*

O Ht foi determinado com microcapilares de vidro que, depois de preenchidos com amostra de sangue, eram vedados e centrifugados a  $13400 \times g$  por 3 min. Um cartão de leitura de microhematócrito foi utilizado para a determinação do seu valor.

### *Hemoglobina total (Hb)*

A Hb foi determinada segundo o método proposto por Drabkin (1948). Dez microlitos de sangue eram adicionados a  $2000\mu\text{L}$  de solução Drabkin. Após leve agitação e mistura do sangue à solução, a densidade óptica era mensurada em 540nm contra um branco contendo apenas a solução de Drabkin.

### *Contagem de células vermelhas – Red Blood Count (RBCC)*

Para a contagem das células vermelhas (em  $\text{mm}^3$ ),  $10\mu\text{L}$  de sangue da amostra eram adicionados a  $2000\mu\text{L}$  de solução de citrato formol. A contagem foi feita em câmara de Neubauer, com microscópio óptico (Olympus) em aumento de 400x.

### *Índices hematimétricos*

O volume corpuscular médio (VCM) foi calculado como  $\text{Ht} \times 10 / \text{RBC}$ ; a hemoglobina corpuscular média (HCM) foi calculada como  $\text{Hb total} \times 10 / \text{RBC}$ ; e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) como  $\text{Hb total} \times 100 / \text{Ht}$ .

### *Metahemoglobina (MetaHb)*

A porcentagem de MetaHb foi determinada segundo o método de Matsuoka (1997). Uma alíquota de 6 µl de sangue foi misturada a 1,2 ml de água destilada e deixada em repouso por 2 minutos. Após este período foram adicionados 600 µl de tampão fosfato (0,1M pH 6,8). Esta mistura era centrifugada a  $500 \times g$  por 2 minutos. O sobrenadante foi utilizado na determinação da formação de MetaHb. No sobrenadante, foram realizadas quatro leituras em espectrômetro óptico, a 563 nm:

- 1) A densidade óptica de 600 µl do sobrenadante, denominada D<sub>1</sub>.
- 2) A este sobrenadante foram adicionados 4 µl de KCN 0,9M, e a leitura foi realizada após 30 segundos. Esta leitura é denominada D<sub>2</sub>. As leituras D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> foram feitas contra um branco de água. Já as leituras D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> foram feitas contra um branco de água e 60 µl de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.
- 3) A leitura D<sub>3</sub> foi feita com 600 µl de sobrenadante e 60 µl de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> após reação por 2 minutos.
- 4) A determinação de D<sub>4</sub> foi feita utilizando-se o produto de D<sub>3</sub> adicionado de KCN, após 30 segundos de reação.

O cálculo da porcentagem de metahemoglobina foi feito de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{MetaHb \%} = [(D_2 - D_1) \times 100] / [(D_4 - D_3) \times 1,1]$$

### **4.6.3 Neurotoxicidade**

#### *Acetilcolinesterase (AChE) "in vivo"*

Uma porção de músculo branco e cérebro era homogeneizado em tampão Glicerina/Fosfato 20 mM pH 7,0, na proporção de 1:20, em homogeneizador rotativo (Turrax<sup>®</sup> T10, Ika) na velocidade intermediária sob banho de gelo. O homogeneizado era centrifugado a  $13\,400 \times g$  por 10 min a 4 °C e o sobrenadante, utilizado como fonte de enzima

A atividade de hidrólise da acetilcolina pela AChE foi determinada cineticamente na presença de ditiobisnitrobenzóico (DTNB), acompanhando a formação de 5-tio-2-nitrobenzoato a 412 nm (ELLMAN et al., 1961). A mistura da reação era composta por:

tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico 100 mM pH 7,5; acetiltiocolina 3,75 mM; e DTNB 6,4mM. A atividade da acetilcolinesterase foi expressa em unidades (UI) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1µmol de 5-tio-2-nitrobenzoato por minuto. O valor do coeficiente de extinção molar do 5-tio-2-nitrobenzoato foi 16950 (mM.cm)<sup>-1</sup>.

#### *Acetilcolinesterase (AChE) “in vitro”*

A AChE cerebral de *B. amazonicus* era ensaiada na presença de Galgotrin<sup>®</sup>, em cérebro de *B. amazonicus*, pelo método de Ellman et al. (1961) tal como descrito anteriormente. Foi utilizado o cérebro de três animais para os ensaios enzimáticos.

No momento dos ensaios enzimáticos *in vitro*, os tecidos foram homogeneizados em tampão de homogeneização (50% tampão Tris - Fosfato de Sódio 50mM pH 7,0 e 50% glicerina anidra). Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 10 000 × g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados como fonte enzimática. A proteína foi determinada nestes sobrenadantes (KRUGER, 1994) e a atividade específica foi expressa em UI (mg de proteína<sup>-1</sup>) e em porcentagem da atividade máxima.

A resposta da AChE cerebral foi ensaiada variando-se a concentração do princípio ativo de Galgotrin<sup>®</sup> entre 10 e 1000 µM, previamente dissolvido em Triton X-100. A concentração do substrato acetiltiocolina foi mantida em 3,75 mM e o inseticida foi pré-incubado com a amostra biológica (sobrenadante) por 1 minuto antes do ensaio enzimático. Os ensaios foram feitos em duplicata para todos os animais ( $n=3$ ); os ensaios sem o inseticida foram chamados de controle (0 µM de Galgotrin<sup>®</sup>). Para todas as concentrações de inseticida, era ensaiado um branco de reação. A mistura do branco de reação era composta por tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico (100 mM pH 7,5); DTNB 6,4mM, acetiltiocolina 3,75 mM; inseticida e sobrenadante inativado termicamente (sobrenadante fervido). O sobrenadante inativado era preparado na hora do ensaio após fervura por 10 minutos. Uma UI foi definida como 1µmol de 5-tio-2-nitrobenzoato formado por minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de 16,950 (mM.cm)<sup>-1</sup>.

#### *Análise estatística*

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias dos grupos controle e exposto ao xenobiótico foram comparadas por um teste paramétrico (teste t de *Student*) ou não-paramétrico (Mann-Whitney), com intervalo de confiança de 95%.

As variáveis enzimáticas foram expressas em gráfico de caixa ou “box plot”. Esta representação gráfica permite a visualização da distribuição das amostras e o “box” sintetiza 50% dos dados, sendo que as extremidades inferior e superior do “box” representam o primeiro (25%) e o terceiro quartil (75%), respectivamente. As demais variáveis foram representadas como histogramas, com média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.6.4 Histopatologia de brânquias

Amostras de brânquias foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,3). Após a fixação, as amostras foram desidratadas em bateria crescente de etanol (70-95%) por 1 hora cada e, em seguida, foram embebidas em etanol 95% e historesina pura (Leica, Alemanha) por 4 horas. Posteriormente, as amostras ficaram ‘overnight’ em historesina pura (Leica, Alemanha) para inclusão. Após a inclusão, cortes histológicos de 3  $\mu$ m foram confeccionados longitudinalmente em micrótomo (Micron HM 360), coradas com Azul de Toluidina, e utilizadas para análises histopatológicas. Os cortes foram analisados em microscópio óptico Olympus BX51 (Olympus, Denmark) com auxílio do software Motic Image Plus 2.0.

A ocorrência de alterações histopatológicas nos tecidos foi avaliada pelo cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH). O IAH foi calculado de acordo com a frequência e severidade de cada alteração histológica (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC; 1994; SILVA, 2004).

$$\text{Índice de Alteração Histológica (IAH)} = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$$

Onde:  $\sum I$ ,  $\sum II$  e  $\sum III$  correspondem ao número total de alterações em cada estágio e  $10^0$ ,  $10^1$  e  $10^2$  são fatores para o cálculo do IAH conforme a severidade da alteração tecidual. Os valores de IAH são classificados em 5 faixas tal como descrito na tabela 3.

**Tabela 3** - Classificação da severidade das alterações do órgão conforme o Índice de Alterações Histopatológicas (IAH).

| IAH      | Classificação                           |
|----------|---|
| 0 -10    | Funcionamento normal do órgão           |
| 11 a 20  | Danos leves a moderados no órgão        |
| 21 a 50  | Alterações moderadas a severas no órgão |
| 50 a 100 | Alterações severas no órgão             |
| > 100    | Danos irreparáveis no órgão             |

Fonte: Elaborado pela a autora.

Além disso, as alterações observadas estão descritas na Tabela 4 e foram classificadas em estágios I, II e III, de acordo Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) modificado por Cerqueira e Fernandes (2002).

#### *Análise estatística do IAH*

A normalidade dos dados de IAH foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias dos grupos controle e exposto ao xenobiótico foram comparadas por um teste não-paramétrico (Mann-Whitney), visto que os dados não apresentaram uma distribuição normal. As variáveis foram representadas em barras, com média  $\pm$  desvio padrão ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 4** - Classificação das alterações histopatológicas de brânquias em estágios de comprometimento da função do órgão.

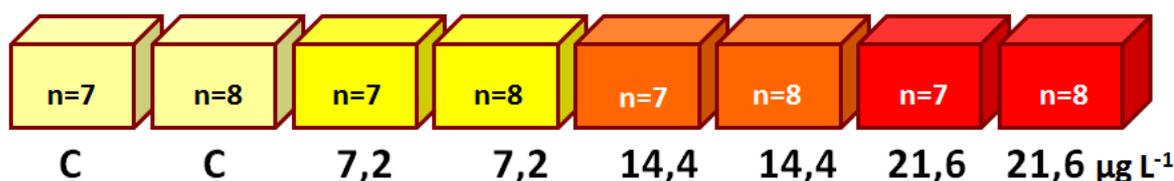
| <b>Estágios</b>                              |   |               |
|--|---|---------------|
| <b>I</b>                                     | <b>II</b>                                     | <b>III</b>    |
|  | Fusão completa de todas as lamelas            | Fibrose       |
| Hipertrofia do Epitélio da lamela            | Ruptura e descamação do epitélio do filamento | Necrose focal |
| Hiperplasia do Epitélio da lamela            | Ruptura do epitélio da lamela                 | Necrose total |
| Decréscimo do espaço interlamelar            | Hemorragia com ruptura do epitélio            |               |
| Descolamento do epitélio da lamela           | Aneurismas                                    |               |
| Descolamento do epitélio do filamento        |   |               |
| Fusão incompleta das lamelas                 |   |               |
| Fusão completa de algumas lamelas            |   |               |
| Hipertrofia e Hiperplasia de células mucosas |   |               |
| Células mucosas vazias ou ausentes           |   |               |
| Hipertrofia e Hiperplasia de Células Cloreto |   |               |
| Dilatação dos vasos sanguíneos               |   |               |
| Aneurisma apical                             |   |               |

Fonte: Elaborado pela a autora.

#### 4.7 EXPERIMENTO III: Exposição subletal ao Galgotrin® por 96 horas – Avaliação da genotoxicidade

Sessenta peixes foram divididos (controle: 53±10 g e 15±2 cm; 20%: 35±15 g e 11±1 cm; 40%: 52±10 g e 14±2 cm; 60%: 50±12 g e 15±2 cm) em oito tanques de 250 L. Este experimento foi realizado em DIC, com um  $n=15$  para cada condição experimental (Figura 24). O experimento ocorreu em duplicata, sendo que dois tanques receberam  $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (20% CL50;96h) do ingrediente ativo, dois tanques receberam  $14,4 \mu\text{g L}^{-1}$  (40% da CL50;96), dois tanques receberam  $21,6 \mu\text{g L}^{-1}$  (60% CL50;96h) e dois tanques não receberam o xenobiótico, sendo denominados tanques-controle.

**Figura 24** - Representação gráfica do terceiro experimento da exposição subletal ao Galgotrin®,  $n=15$  por condição experimental ( $n=7$  ou 8 por caixa). C = controle, sem inseticida; concentrações nominais de cipermetrina em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pela a autora.

A concentração de 20% da CL50 foi escolhida por ser próxima à concentração recomendada em pisciculturas ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ); a concentração de 60% da CL50, por ser próxima da concentração limite de piretroides na água potável ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ), recomendada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2005b).

Os animais foram aclimatados e alimentados diariamente neste sistema por uma semana. A alimentação foi suspensa 24 h antes do início assim permanecendo até o final do experimento.

A exposição às concentrações subletais de Galgotrin® ocorreu em um sistema estático e com aeração constante. A qualidade da água (temperatura, pH, oxigênio dissolvido, amônia, dureza e alcalinidade) foi monitorada diariamente, segundo Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011) (Tabela 5).

Após 96 h de exposição, os peixes foram amostrados. Os animais foram anestesiados por imersão em eugenol 1:20 (em etanol) (INOUE et al., 2003) e o sangue foi coletado por punção caudal com seringas heparinizadas. Logo após, os peixes foram abatidos por secção medular e foi realizada a biometria. Uma porção de fígado foi rapidamente retirada e homogeneizada em soro bovino fetal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O sangue puro foi diluído em soro bovino fetal na proporção 1:50. As amostras foram conservadas no escuro e mantidas refrigeradas por 10 horas e, logo após, foram processadas para o teste do cometa.

**Tabela 5** - Qualidade da água no experimento III: exposição subletal a 7,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  (20 % da CL50;96h), 14,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  (40% da CL50;96h) e 21,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  (60% da CL50;96h) de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Média e desvio padrão para o total de coletas de água (n=4).

| <b>Experimento III</b>  | <b>Controle</b> | <b>20%</b> | <b>40%</b> | <b>60%</b> |
|---|-----------------|------------|------------|------------|
| Temperatura (°C)  | 25,6±1          | 26,5±0,5   | 25,5±1     | 25,7±2     |
| Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )                                      | 5,5±0,05        | 5,1 ±0,1   | 5,8±0,2    | 5 ±0,1     |
| Amônia (mg L <sup>-1</sup> )  | 0,60±0,1        | 1±0,5      | 0,75±0,8   | 1,1±0,5    |
| Dureza (mg de CaCO <sub>3</sub> )                                   | 14,2±1,2        | 12,2±1,8   | 9,2±1,2    | 11,4±2,5   |
| Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> de HCO <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) | 24 ±2           | 21 ±3      | 21,5±2     | 23±2       |
| pH  | 7,3±0,2         | 7,3±0,1    | 7,3±0,2    | 7,5±0,3    |

Fonte: Elaborado pela a autora.

#### 4.7.1 Ensaio cometa com eritrócitos

A técnica utilizada para o ensaio cometa foi a descrita por Singh et al. (1988) com modificações segundo Ferraro et al. (2004). O sangue coletado do animal foi armazenado em microtubo e permaneceu sob refrigeração e ao abrigo da luz até a montagem da lâmina. As lâminas utilizadas foram previamente limpas com etanol e preparada com agarose normal (NMP) 1,5% (1,5 g em 100 ml de PBS). As lâminas limpas foram mergulhadas em agarose quente (>60 °C) e o excesso de agarose de um dos lados da lâmina foi retirado com papel. As lâminas foram colocadas em posição horizontal para secar em temperatura ambiente. Foi preparada também agarose de baixo ponto de fusão (LMP) 0,5% (0,1 g em 20 ml de PBS), aquecida até se liquefazer em microondas e mantida a 37 °C em banho-maria para uso.

Dez microlitros da solução de sangue dissolvida em soro bovino fetal foram diluídos em 120 µl de LMP. Esta suspensão foi depositada sobre a lâmina com agarose normal já solidificada e coberta com uma lamínula. Após a adição das células na lâmina, foi evitada a exposição à luz direta (irradiação) para prevenção de danos adicionais ao DNA. Este “sanduiche” (lâmina - material biológico - lamínula) foi acondicionado em refrigerador por cerca de 20 min. Após este período, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas foram acondicionadas na solução de lise, à 4°C por 24 horas. Essa solução era composta por uma alta concentração de sais e detergentes a fim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear.

Decorrido o tempo de exposição à lise, as lâminas foram colocadas cuidadosamente na cuba de eletroforese horizontal para preencher ao máximo os espaços vazios. Quando necessário, os espaços extras foram preenchidos com lâminas limpas, uma vez que essa “placa” de lâminas seria a resistência para a passagem da corrente elétrica. Um tampão de eletroforese alcalino (pH>13) foi adicionado a cuba horizontal até cobrir completamente as lâminas justapostas. A eletroforese foi realizada com a cuba mergulhada em recipiente com gelo, a 4 °C. O DNA ficou desnaturando no tampão alcalino por 30 minutos. Este procedimento objetivou desenovelar as cadeias de DNA, pelo rompimento das estruturas secundária e terciária presentes no núcleo celular. Imediatamente após o desenovelamento, as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica de modo a induzir a migração de fragmentos de DNA no sentido da corrente elétrica. A corrida de eletroforese foi iniciada com 25 volts e 300 miliamperes. Estes parâmetros foram acertados removendo ou adicionando tampão. A corrida ocorreu por 25 minutos.

Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas cuidadosamente e neutralizadas com 5 ml de tampão de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5) por 5 minutos. A lavagem das lâminas com tampão de neutralização foi repetido por mais duas vezes por lâmina. Então, as lâminas foram colocadas para secar na posição inclinada. Após a secagem, foram fixadas com etanol por 5 minutos. Realizado este procedimento, as lâminas poderiam ser estocadas em geladeira para posterior análise. Para coloração foram adicionados 20 µl de brometo de etídio (20 mg L<sup>-1</sup>) na lâmina, que foi coberta com lamínula; depois de descansar por 5 minutos, a lâmina já corada foi então analisada sob microscopia de epifluorescência. As lâminas foram coradas uma a uma e analisadas imediatamente.

#### 4.7.2 Ensaio cometa com células do tecido hepático

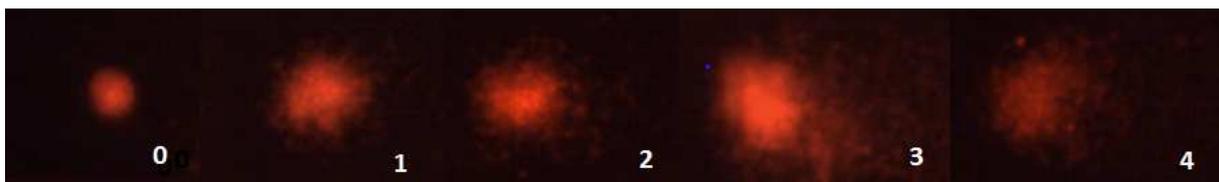
O procedimento para montagem das lâminas com o tecido consistiu do processamento do fígado retirado de cada animal, conforme procedimento de extração descrito anteriormente, com as mesmas condições de conservação do sangue. O fígado foi homogeneizado em homogeneizador rotativo (IKA T10) a  $3000 \times g$  por de 30 segundos. Foram coletados  $13 \mu\text{l}$  do homogeneizado e misturados  $120 \mu\text{l}$  de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida ( $37^\circ\text{C}$ ). A suspensão celular foi utilizada para a montagem das lâminas, segundo os mesmos procedimentos utilizados para as células vermelhas.

Para a visualização dos danos do DNA, as lâminas foram observadas em aumento de  $400\times$  em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação de rodamina ( $515 - 560 \text{ nm}$ ) e um filtro de barreira de  $590 \text{ nm}$ . Foram analisadas 100 nucleóides (cometas) por exemplar. A avaliação ocorreu por meio da análise visual de 100 nucleóides, de acordo com a intensidade da cauda classificada em cinco classes: 0 (sem danos visíveis); 1 (pouco dano); 2 (dano médio); 3 (grande número de danos) e 4 (dano máximo) (figura 25). Os cometas sem a região da cabeça visível foram desconsiderados da contagem, pois representavam DNA totalmente fragmentado, característicos de células inviáveis.

Os escores foram calculados através da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe, como mostrado na fórmula a seguir:

$$\text{Escore} = [(0 \times \text{dano } 0) + (1 \times \text{dano } 1) + (2 \times \text{dano } 2) + (3 \times \text{dano } 3) + (4 \times \text{dano } 4)]$$

**Figura 25** - Cometas de células vermelhas de *Brycon amazonicus* exposto a cipermetrina (Galgotrin) observados com aumento de  $400\times$  em microscópio de epifluorescência e corados com brometo de etídeo. Classe 0 (sem dano aparente); classe 1 (dano pequeno); classe 2 (dano médio); classe 3 (dano extenso) e classe 4 (dano máximo).



Fonte: Elaborado pela a autora.

*Análise estatística do teste cometa*

Levando em consideração que os dados obtidos não se distribuem em uma curva normal, eles foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis quando comparadas mais de duas amostras, e o teste Student-Newman-Keuls para a comparação das médias, considerando-se  $P < 0,05$ .

# 5 Resultados

---

### 5.1 EXPERIMENTO I: Teste de toxicidade aguda (CL50;96h) e sinais de intoxicação

Para a espécie *Brycon amazonicus*, a Concentração Letal para 50% da população (CL50) de 96h para a cipermetrina, na formulação Galgotrin® (Milenia), foi 36,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , com limite inferior de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  e limite superior de 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ). A mortalidade ocorreu apenas nas primeiras 24 horas do teste. As sete concentrações testadas (e o controle) e a mortalidade em cada concentração encontram-se dispostas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Mortalidade de matrinxã *B. amazonicus* submetido ao teste de toxicidade aguda (CL50;96h) para a cipermetrina, na formulação Galgotrin®.

| i.a. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | <i>n</i> final | mortalidade (%) |
|-------------------------------|----------------|-----------------|
| 0                             | 9              | 0               |
| 5                             | 9              | 0               |
| 10                            | 9              | 0               |
| 20                            | 9              | 0               |
| 30                            | 9              | 0               |
| 40                            | 1              | 88              |
| 70                            | 0              | 100             |
| 100                           | 0              | 100             |

O número inicial de peixes foi de  $n=9$ ; i.a.= ingrediente ativo da formulação comercial.  
Fonte: Elaborado pela a autora.

Durante o teste de toxicidade aguda, alguns sinais de intoxicação foram constatadas, sendo mais evidentes nas concentrações mais elevadas. Observou-se assim nos animais expostos: maior abertura da boca e do opérculo dos peixes, perda de equilíbrio, perda de coloração (animais pálidos), nado agitado e natação súbita após períodos de inatividade prolongados.

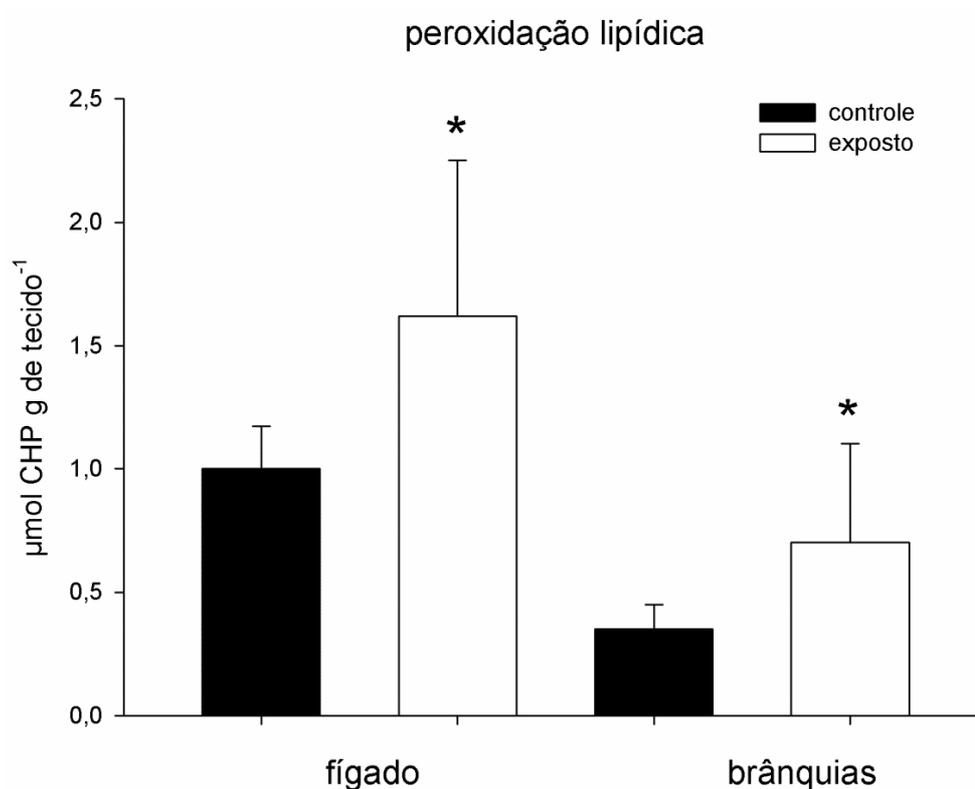
## 5.2 EXPERIMENTO II: Exposição subletal ao Galgotrin® por 96 horas

Não se observou mortalidade dos animais e nem sinais de intoxicação na exposição subletal.

### 5.2.1 Balanço redox

No fígado dos animais expostos, verificamos aumento de hidroperóxidos de lipídios em 62% ( $P=0,023$ ). Nas brânquias, constatamos um aumento hidroperóxidos de lipídios em 100% ( $P=0,011$ ) nos animais exposto ao Galgotrin® (Figura 26).

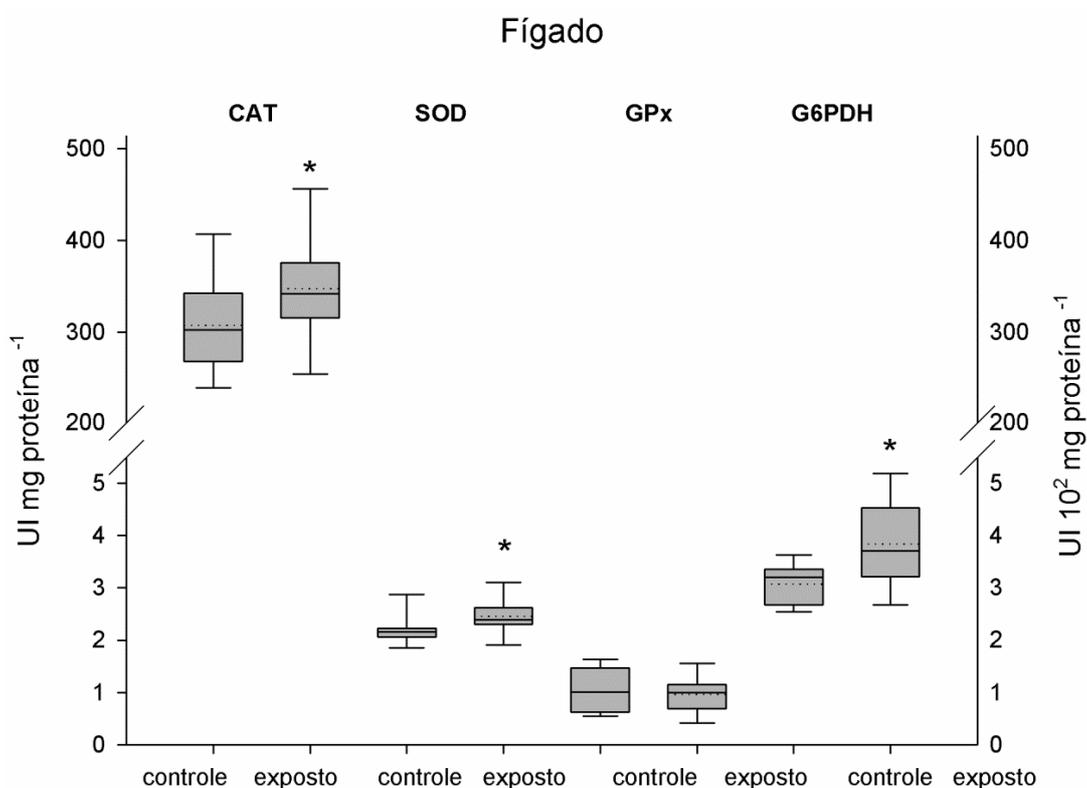
**Figura 26** - Peroxidação lipídica de fígado e brânquias de *Brycon amazonicus* exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin®, por 96 horas. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

No fígado, observamos aumento significativo de 14% ( $P=0,015$ ) na atividade de catalase. A atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase aumentou 26% ( $P=0,019$ ) e a superóxido dismutase 11% ( $P=0,02$ ) (Figura 27).

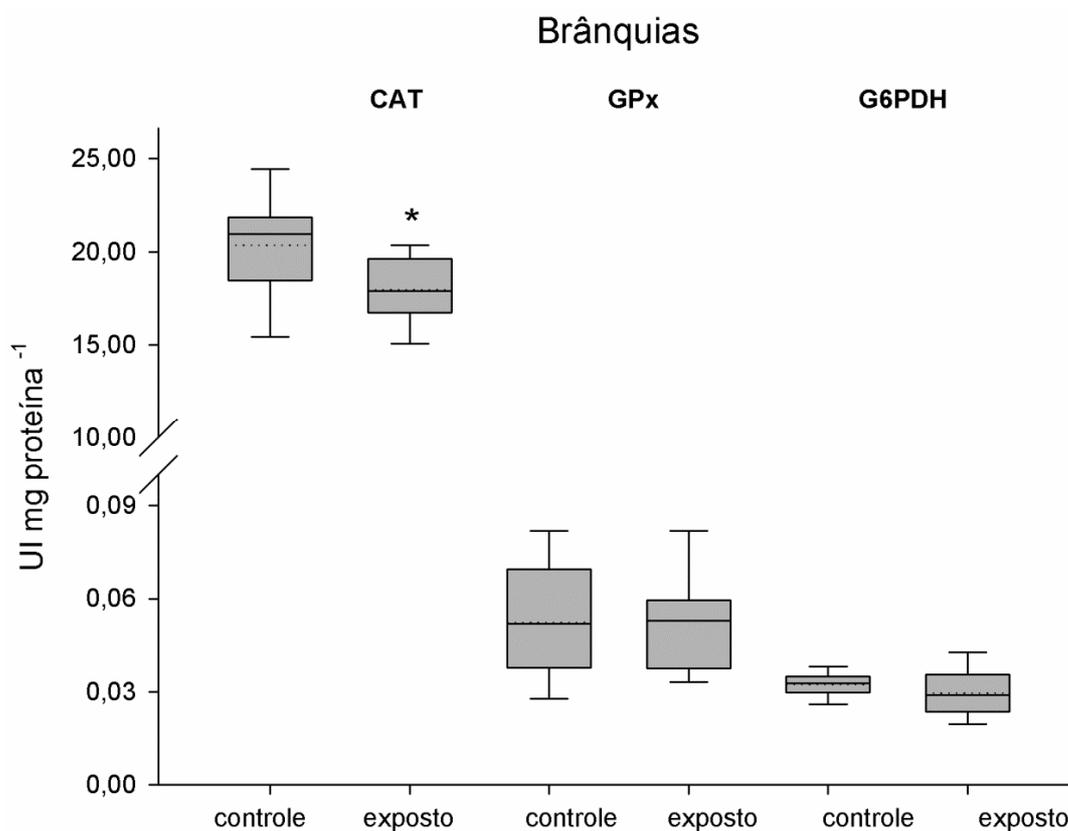
**Figura 27** - Atividade das enzimas hepáticas catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e superóxido dismutase (SOD) de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). A enzima G6PDH está representada em UI  $10^2$  mg proteína<sup>-1</sup>. Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

Nas brânquias dos animais expostos, verificamos redução de 12% ( $P=0,013$ ) na atividade de catalase. As demais enzimas avaliadas não sofreram alteração significativa (Figura 28).

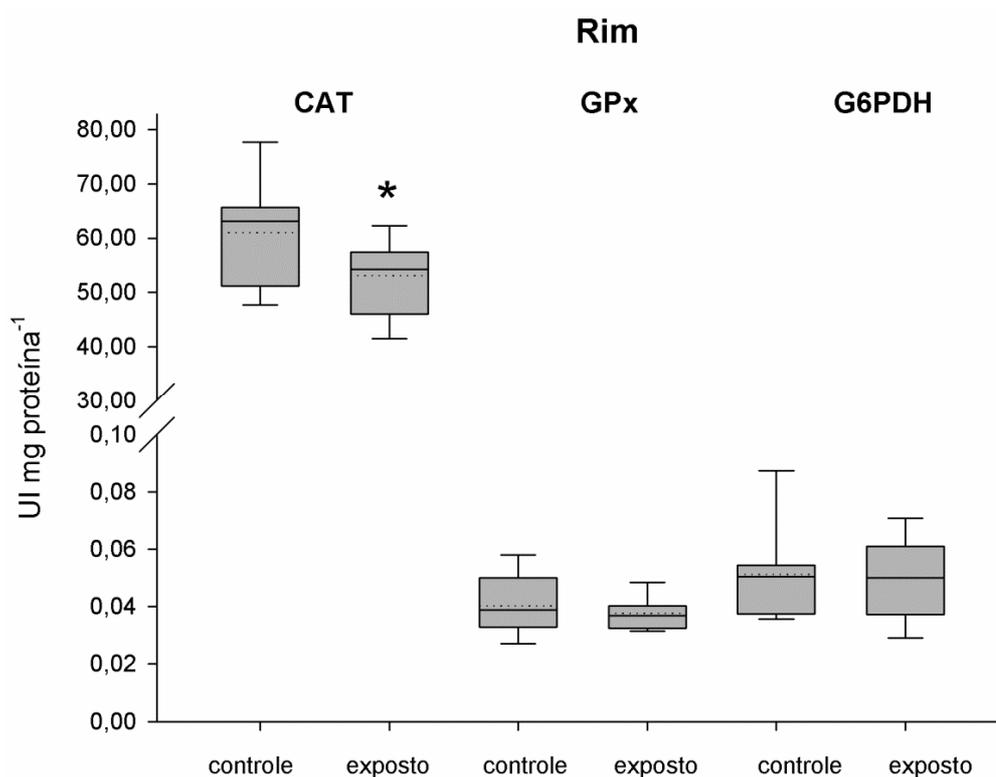
**Figura 28** - Atividade das enzimas branquiais catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin®, após 96 h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

No rim dos animais expostos, verificamos redução de 13% ( $P=0,02$ ) da atividade de catalase. A atividade das demais enzimas avaliadas não foi alterada significativamente (Figura 29).

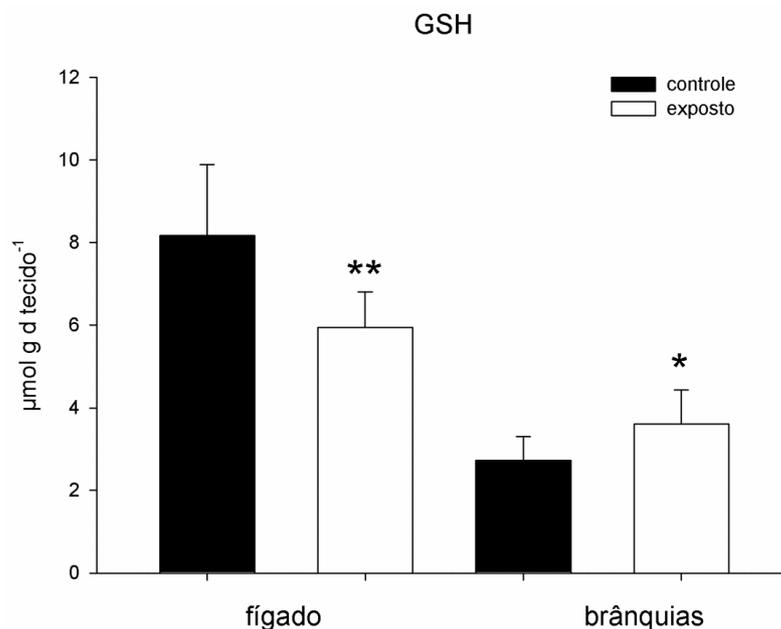
**Figura 29** - Atividade das enzimas renais catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PDH) de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

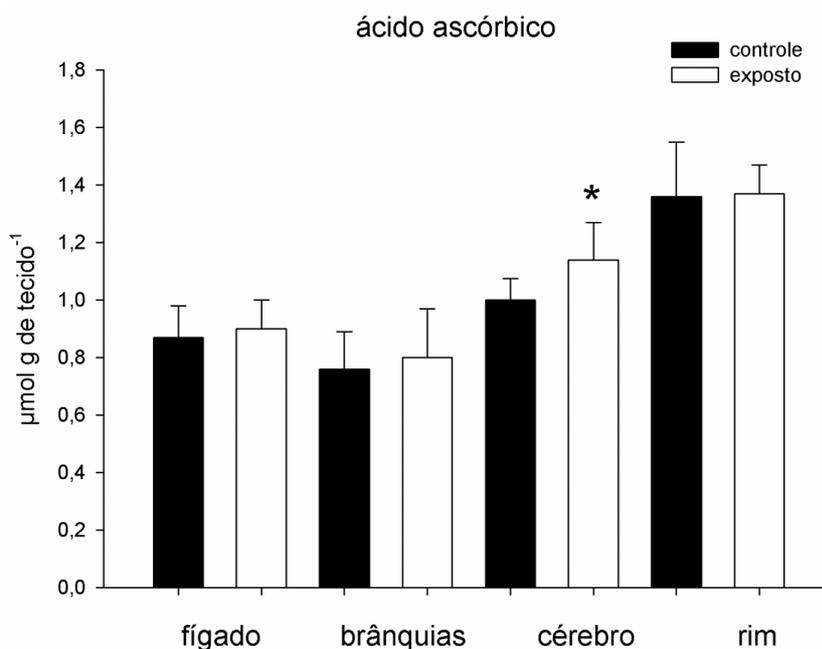
A glutationa (GSH), um antioxidante não enzimático, foi quantificada em fígado e brânquias. Sua concentração reduziu cerca de 30% ( $P<0,001$ ) no fígado dos animais expostos. Porém, aumentou 25% ( $P=0,002$ ) no tecido branquial (Figura 30). O ácido ascórbico foi quantificado em fígado, brânquias, cérebro e rim. A concentração de ácido ascórbico aumentou significativamente em 11% ( $P=0,009$ ) no cérebro. Nos demais tecidos, não verificamos alteração significativa (Figura 31).

**Figura 30** - Concentração de glutatona (GSH) em fígado e brânquias de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ . (\*\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,001$ ); (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

**Figura 31** - Concentração de ácido ascórbico em fígado, brânquias, cérebro e rim de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



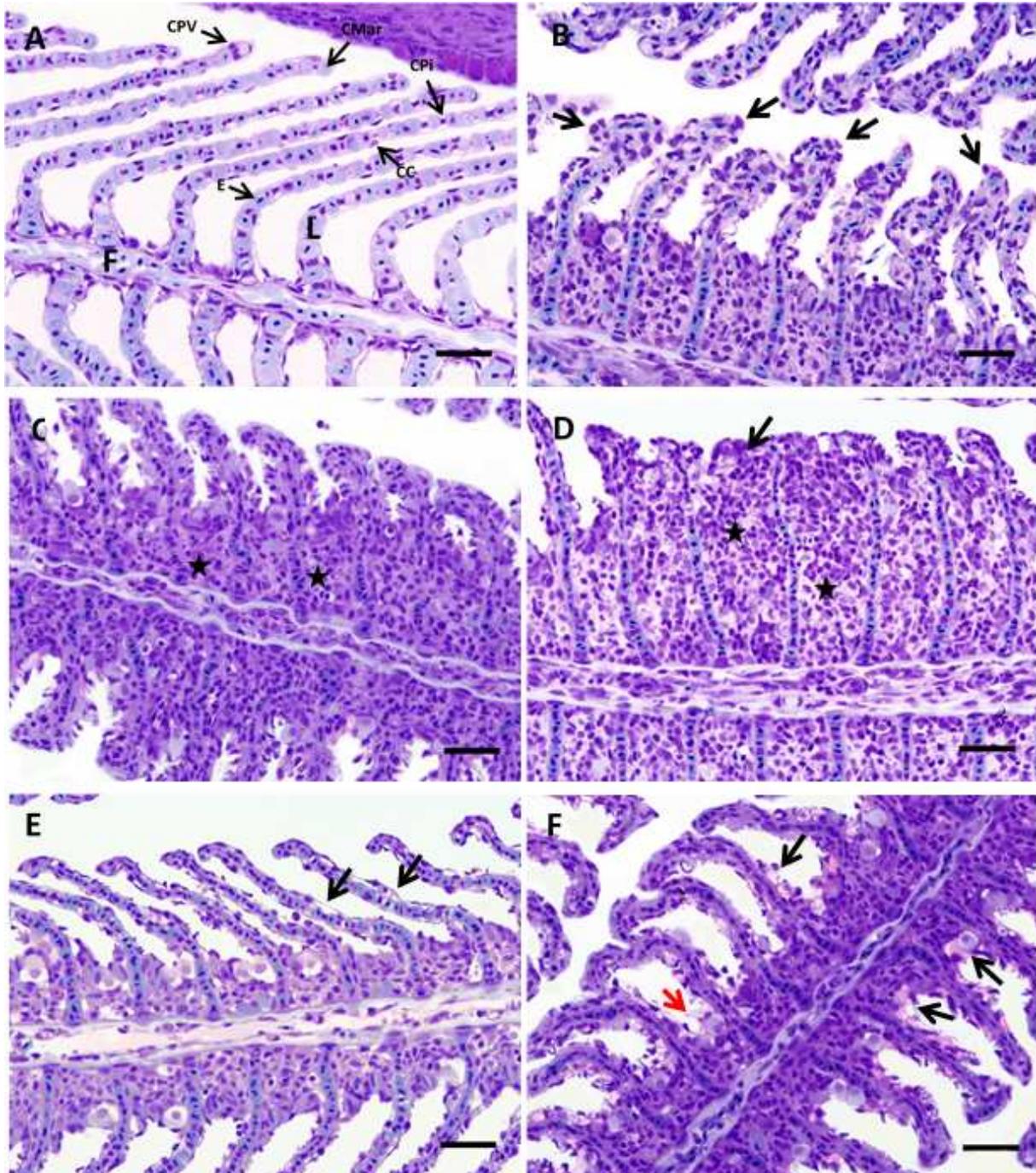
Fonte: Elaborado pela a autora.

### 5.2.2 Histopatologias de brânquias

Os animais expostos a 20% da CL50;96h de Galgotrin<sup>®</sup> apresentaram alterações histopatológicas nas brânquias, como mostrado nas Figuras 32 e 33. A estrutura normal do tecido branquial está apresentada na Figura 32: A. As principais alterações morfológicas encontradas em brânquias de *B. amazonicus* estão apresentadas nas figuras 32: B a 32: F e figuras 33: A a 33: D.

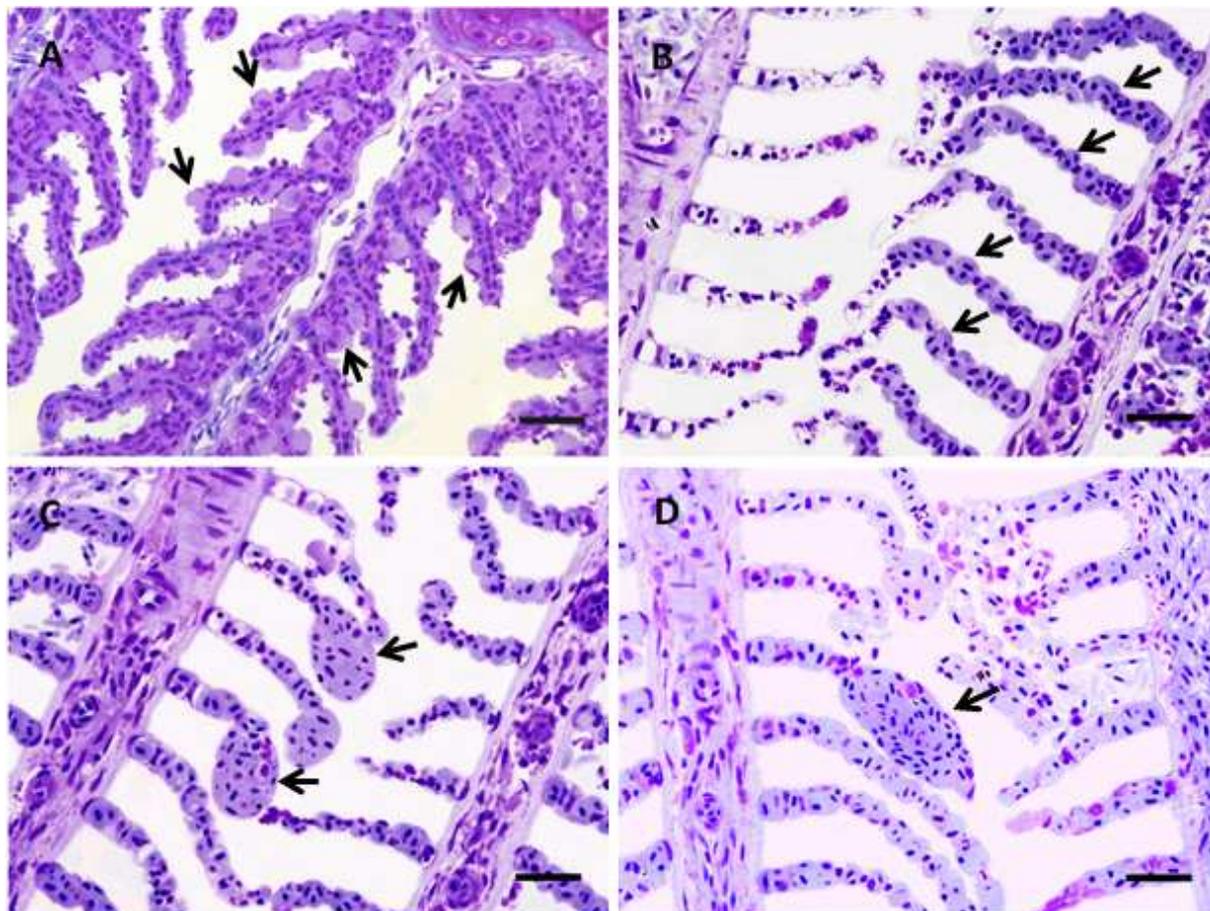
Após 96 horas de exposição ao Galgotrin<sup>®</sup>, as alterações mais evidentes foram as histopatologias de estágio I e II (Tabela 7). As alterações de estágio I observadas foram: hipertrofia e hiperplasia de células cloreto, dilatação dos vasos sanguíneos e aneurisma apical. As alterações de estágio II foram: aneurisma e hemorragia com ruptura do epitélio. Neste tecido, não foram observadas alterações histopatológicas de estágio III. Os animais controle apresentaram maior frequência de hipertrofia de células mucosas e células mucosas vazias ou ausentes (Figura 32: F).

**Figura 32** – Fotomicrografias de brânquias de *Brycon amazonicus* expostos a 7,2 $\mu$ g/L de cipermetrina (Galgotrin®). **A.** Estrutura branquial normal; **B.** Hipertrofia do epitélio da lamela; **C.** (\*) Indica hiperplasia do epitélio do filamento; **D.** (\*) Indica hiperplasia do epitélio da lamela e seta preta indica fusão; **E.** Descolamento do epitélio lamelar; **F.** Hiperplasia e hipertrofia de Células Mucosas – seta vermelha indica célula mucosa vazia. Abreviações: CMar = canal marginal; CPV = células pavimentosas; E = eritrócito; CPi = células pilares; CC = célula cloreto. **L.** Lamela; **F.** Filamento. Escala = 20  $\mu$ m.



Fonte: Elaborado pela autora.

**Figura 33** - Fotomicrografias de brânquias de *Brycon amazonicus* exposto a 7,2µg/L de Cipermetrina. **A.** Hiperplasia e hipertrofia de células cloreto; **B.** Dilatação de vasos sanguíneos; **C.** Aneurisma apical; **D.** Aneurisma. Escala = 20 µm. Coloração = Azul de Toluidina.



Fonte: Elaborado pela a autora.

O índice de alterações histopatológicas (IAH) dos animais expostos ( $IAH = 25,5 \pm 5,8$ ) indica que as brânquias apresentaram alterações de moderadas a severas, enquanto que o IAH dos animais controle ( $IAH = 9,5 \pm 0,5$ ) indica funcionamento normal do órgão (Figura 34). O aumento de IAH do grupo exposto foi significativo ( $P=0,02$ ).

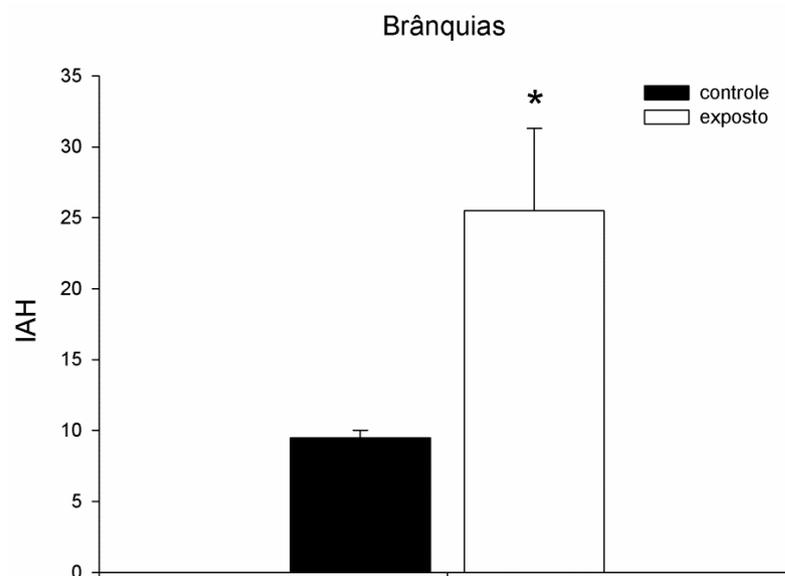
**Tabela 7** - Ocorrência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *Brycon amazonicus* expostos a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas.

|   | <b>Alteração</b>                              | <b>Estágio</b> | <b>Controle</b> | <b>Exposto</b> |
|---|---|----------------|-----------------|----------------|
| <b>Hiperplasia ou Hipertrofia do epitélio branquial</b> | Hipertrofia do Epitélio da lamela             | <b>I</b>       | +               | +              |
|   | Hiperplasia do Epitélio do filamento          | <b>I</b>       | +               | +              |
|   | Hiperplasia do Epitélio da lamela             | <b>I</b>       | +               | +              |
|   | Decréscimo do espaço interlamelar             | <b>I</b>       | +               | +              |
|   | Descolamento do epitélio da lamela            | <b>I</b>       | 0+              | 0+             |
|   | Descolamento do epitélio do filamento         | <b>I</b>       | 0               | 0              |
|   | Fusão incompleta das lamelas                  | <b>I</b>       | 0+              | 0+             |
|   | Fusão completa de algumas lamelas             | <b>I</b>       | 0+              | 0+             |
|   | Fusão completa de todas as lamelas            | <b>II</b>      | 0               | 0              |
|   | Ruptura e descamação do epitélio do filamento | <b>II</b>      | 0               | 0              |
| Ruptura do epitélio da lamela                           | <b>II</b>                                     | 0              | 0               |                |
| <b>Alterações nas células mucosas e cloreto</b>         | Hipertrofia e Hiperplasia de células mucosas  | <b>I</b>       | +               | 0+             |
|   | Células mucosas vazias ou ausentes            | <b>I</b>       | +               | 0              |
|   | Hipertrofia e Hiperplasia de células cloreto  | <b>I</b>       | +               | ++             |
| <b>Alterações dos vasos sanguíneos</b>                  | Dilatação dos vasos sanguíneos                | <b>I</b>       | 0+              | ++             |
|   | Aneurisma apical                              | <b>I</b>       | 0+              | +              |
|   | Hemorragia com ruptura do epitélio            | <b>II</b>      | 0               | 0+             |
|   | Aneurismas                                    | <b>II</b>      | 0               | 0+             |
| <b>Alterações de estágio terminal</b>                   | Fibrose                                       | <b>III</b>     | 0               | 0              |
|   | Necrose focal                                 | <b>III</b>     | 0               | 0              |
|   | Necrose total                                 | <b>III</b>     | 0               | 0              |

**0 = ausentes; 0+ = raramente frequentes; + = frequente; ++ = muito frequente; +++ = extremamente frequente.**

Fonte: Elaborado pela a autora.

**Figura 34** - Índice de alterações histopatológicas (IAH) de brânquias de *B. amazonicus* exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=4$ . \* indica diferença significativa ( $P<0,05$ ).

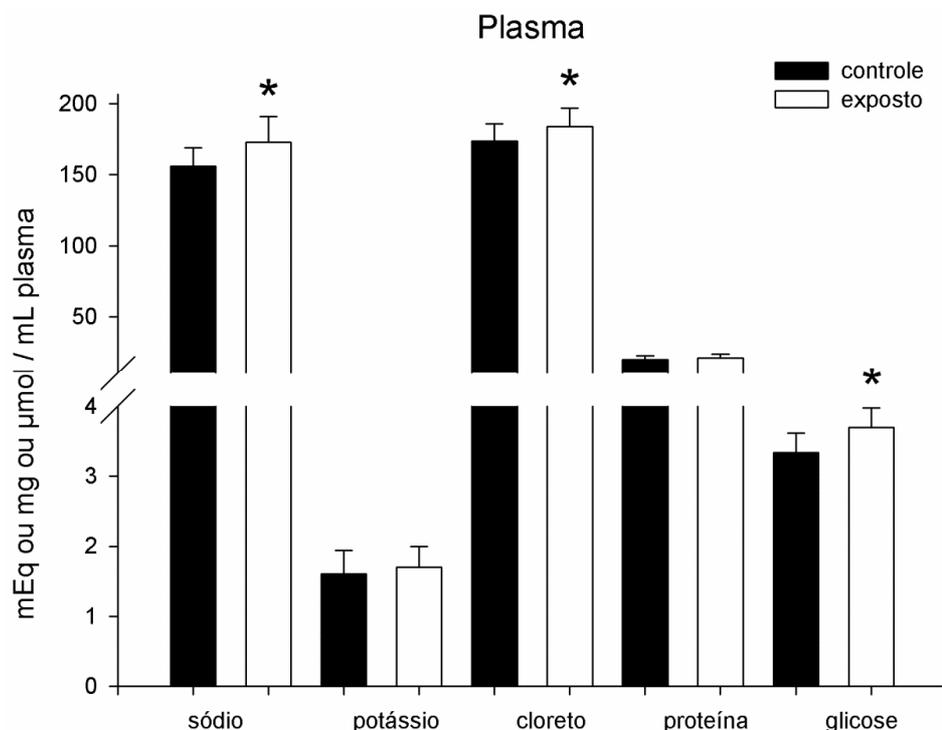


Fonte: Elaborado pela a autora.

### 5.2.3 Balanço iônico e variáveis hematológicas

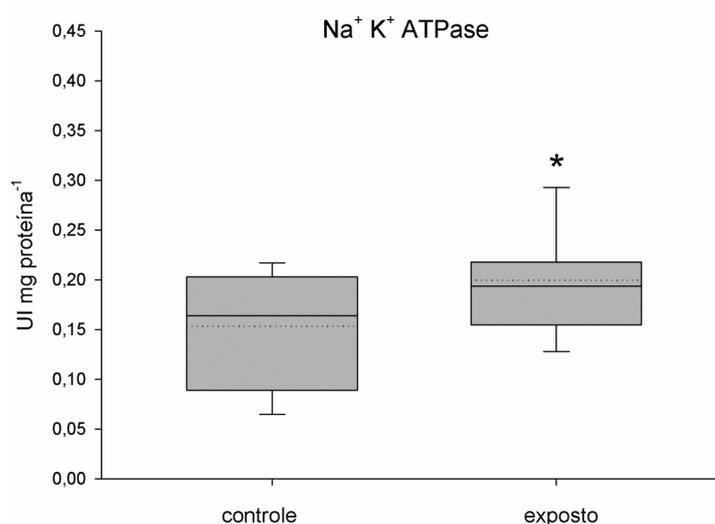
No plasma, foram determinadas as concentrações de proteína e dos íons sódio, potássio e cloreto para avaliar alterações osmorregulatórias. Nos animais expostos, verificamos aumento da concentração dos íons sódio em 10% ( $P=0,01$ ) e cloreto em 7% ( $P=0,02$ ). As concentrações de potássio e proteína não alteraram (Figura 35). Além disso, a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase branquial dos animais expostos aumentou 30% ( $P=0,04$ ) (Figura 36). A concentração de glicose plasmática aumentou 12% ( $P=0,004$ ).

**Figura 35** - Concentrações dos íons (mEq/mL), de proteína (mg/mL) e de glicose ( $\mu\text{mol/mL}$ ) plasmáticos em matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

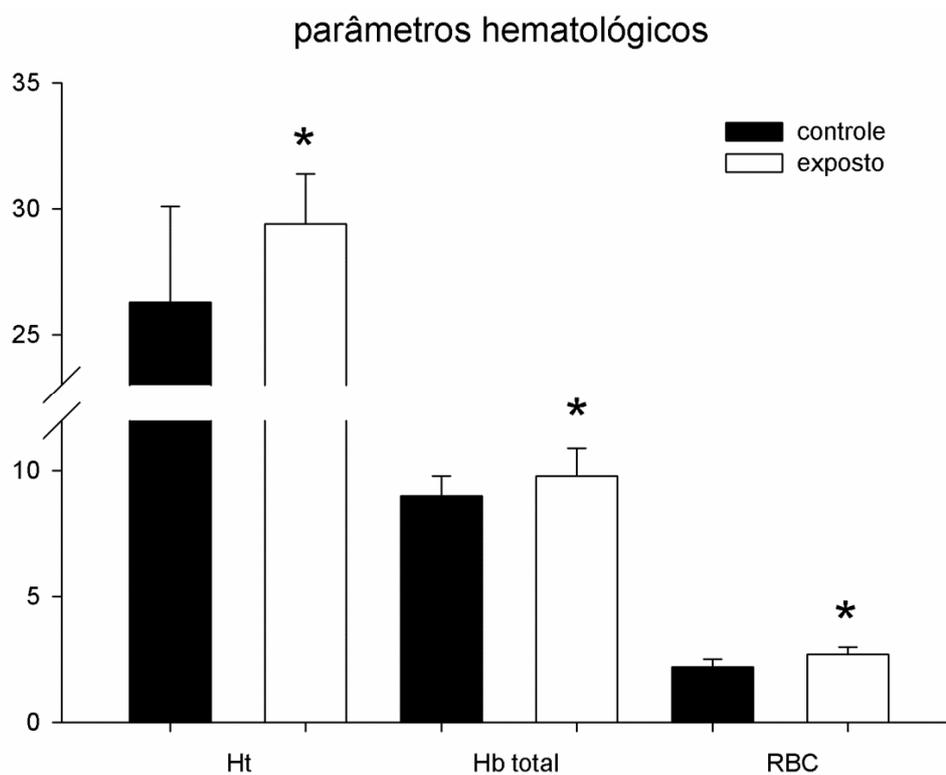
**Figura 36** - Atividade da enzima branquial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina (Galgotrin<sup>®</sup>), após 96h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

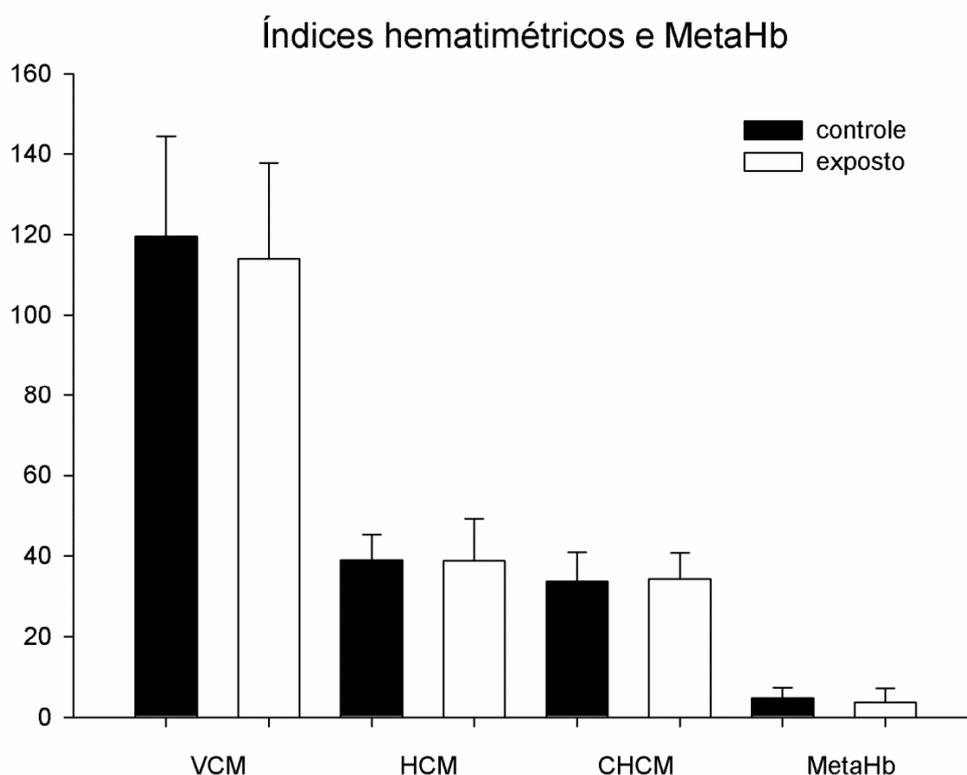
Matrinxã exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, apresentou aumento no microhematócrito ( $P=0,03$ ), no número de células vermelhas (RBCC) ( $P=0,004$ ) e na concentração de hemoglobina total ( $P=0,04$ ) (Figura 37). Os índices hematimétricos e a concentração de metahemoglobina não apresentaram alterações significativas (Figura 38).

**Figura 37** - Variáveis hematológicas de *B. amazonicus* exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>. Ht (microhematócrito) está expresso em %; Hb (hemoglobina total) em  $\text{g dL}^{-1}$ ; RBCC (número de células vermelhas) em  $10^6$  de células  $\text{mm}^{-3}$ . Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ . (\*) indica diferença significativa entre grupo exposto e controle ( $P<0.05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

**Figura 38** - Índices hematimétricos e concentração de metahemoglobina (MetaHb) de *B. amazonicus* exposto a cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>. VCM (volume corpuscular médio) está expresso em  $\mu\text{m}^3$ ; HCM (hemoglobina corpuscular média) em  $\text{pg célula}^{-1}$ ; CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) em  $\text{g dL}^{-1}$ ; MetaHb em %. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para  $n=15$ .

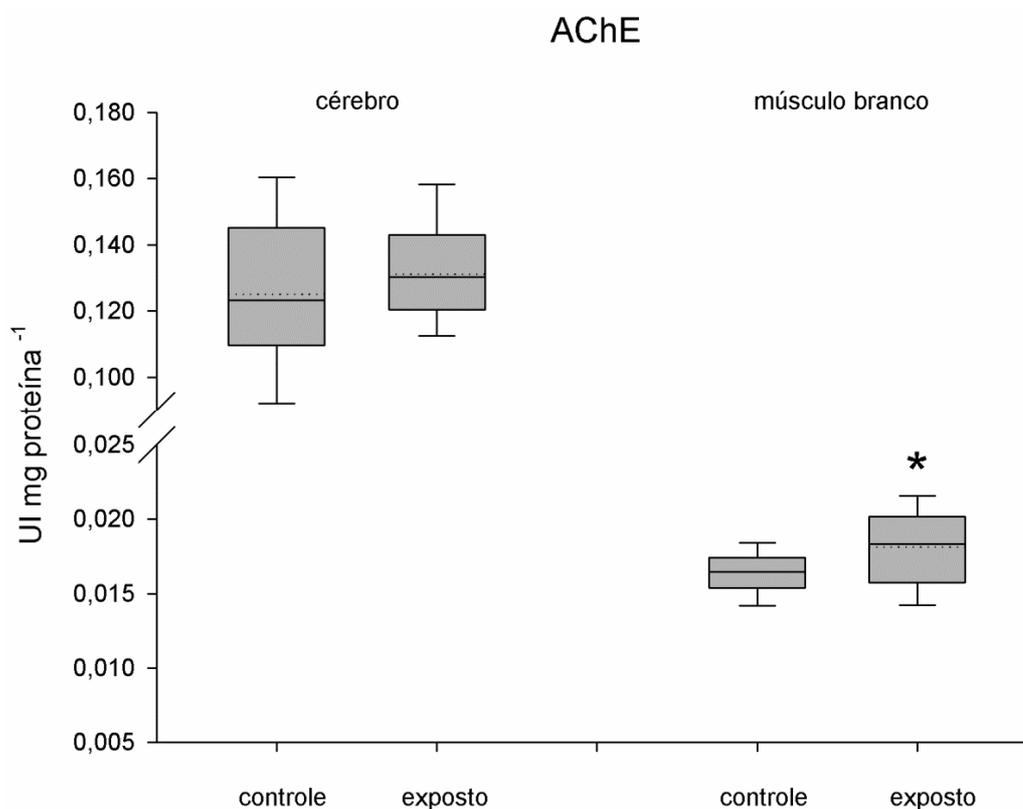


Fonte: Elaborado pela a autora.

#### 5.2.4 Neurotoxicidade

A atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) aumentou cerca de 12% ( $P=0,02$ ) no músculo branco dos animais expostos. No entanto, não verificamos alteração no cérebro (Figura 39).

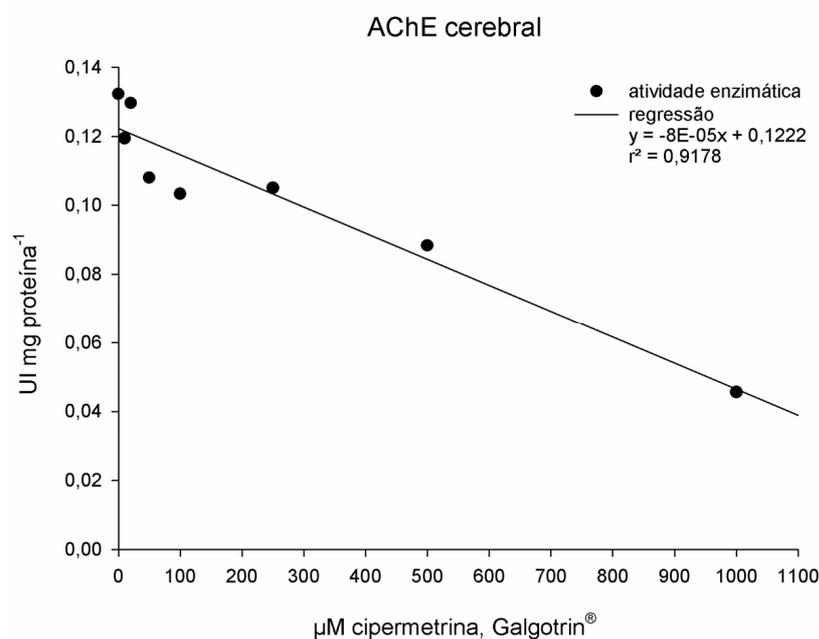
**Figura 39** - Atividade da enzima acetilcolinesterase de matrinxã exposto a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, após 96 h de exposição. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . (\*) indica diferença entre controle e exposto ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

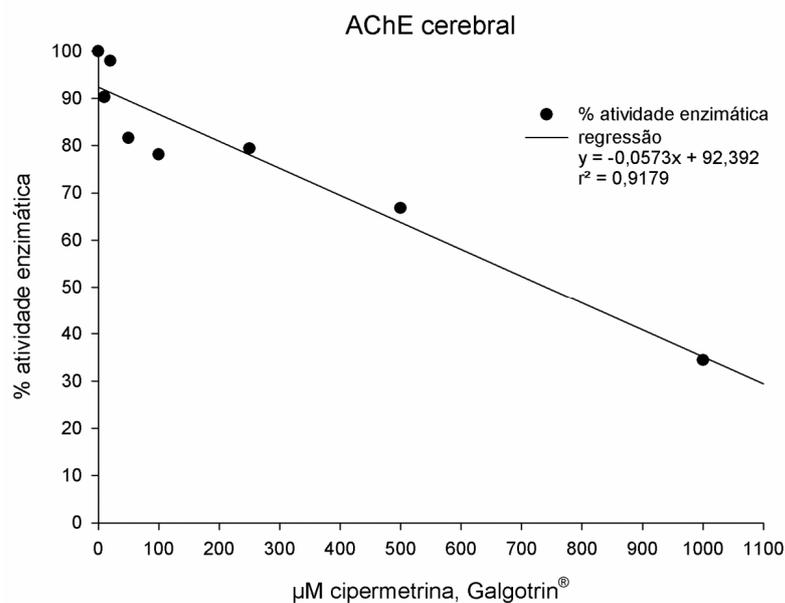
O ensaio *in vitro* da AChE cerebral de *B. amazonicus* na presença do inseticida mostrou redução dessa atividade dependente da concentração do princípio ativo de Galgotrin<sup>®</sup> (Figura 40). Essa redução foi de 65% na presença de 1,0 mM de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup> (Figura 41).

**Figura 40** - Ensaio *in vitro* da atividade da AChE cerebral de matrinxã na presença de diferentes concentrações de cipermetrina Galgotrin®. UI indica unidade internacional ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). Os pontos indicam a média da atividade enzimática ( $n=3$ ) e a linha indica regressão linear.



Fonte: Elaborado pela a autora.

**Figura 41** - Atividade, em porcentagem, do ensaio *in vitro* acetilcolinesterase cerebral de matrinxã na presença de diferentes concentrações de cipermetrina, na formulação Galgotrin®. Os pontos indicam da média atividade enzimática em porcentagem ( $n=3$ ) e a linha indica a regressão linear.



Fonte: Elaborado pela a autora.

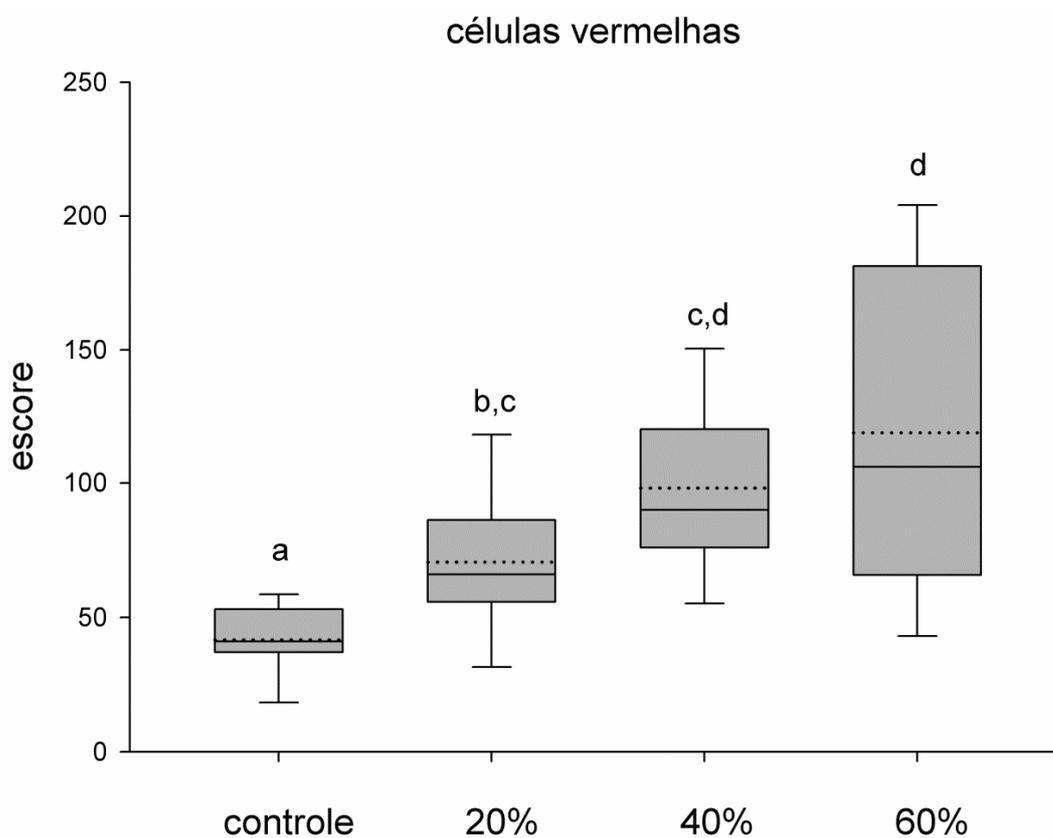
### 5.3 EXPERIMENTO III: Exposição subletal ao Galgotrin<sup>®</sup> por 96 horas – Avaliação da genotoxicidade

A cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, provocou danos ao DNA em células vermelhas (Figura 42) e em hepatócitos (Figura 43) de *B. amazonicus*. Os danos ao DNA possuem uma relação concentração-dependente com o Galgotrin<sup>®</sup> em células vermelhas, visto o aumento progressivo dos danos nas maiores concentrações do princípio ativo.

No sangue, a média do escore de danos ao DNA do grupo exposto a 20% da CL50;96h aumentou em 70% em relação ao grupo controle ( $P=0,018$ ). O grupo exposto a 40% da CL50 apresentou aumento de 98% de danos em relação ao controle ( $P<0,001$ ); e o grupo exposto a 60% da CL50 apresentou aumento de 187% no escore médio em relação ao controle ( $P<0,001$ ). Os grupos 20% e 60% são estatisticamente diferentes entre si ( $P=0,035$ ), mas os grupos 40% e 60% não o são ( $P=0,055$ ).

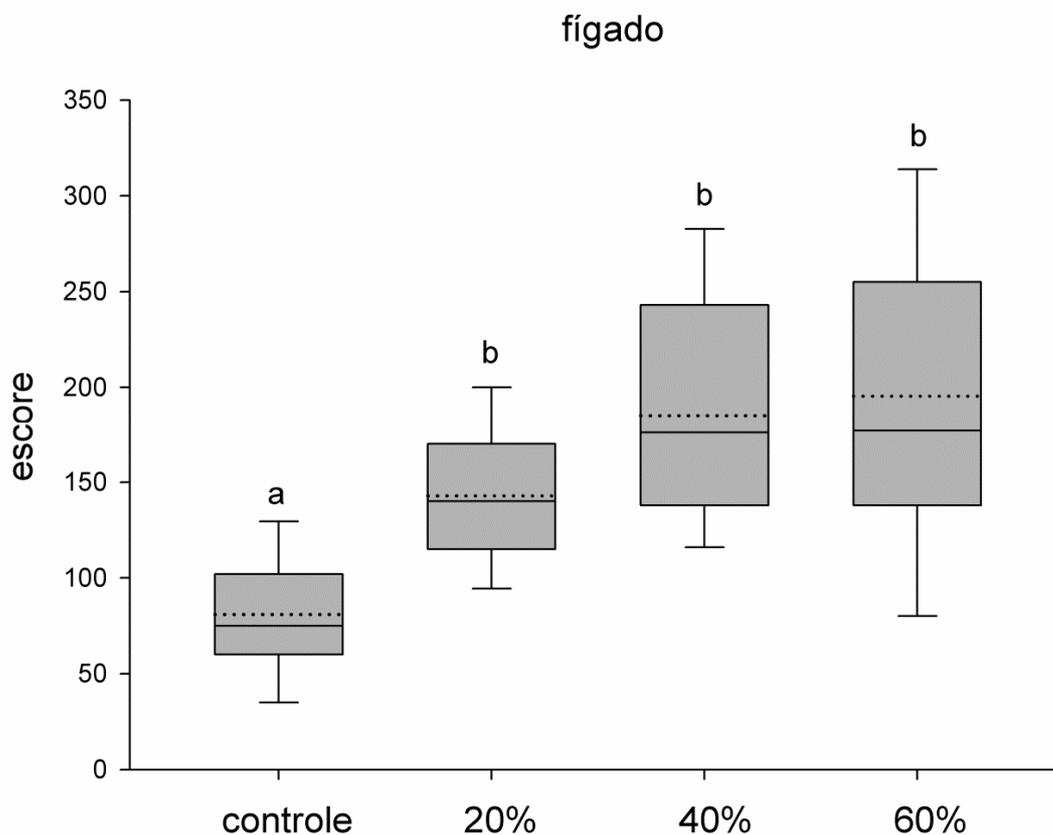
Nos hepatócitos, a média do escore de danos ao DNA do grupo exposto a 20% da CL50;96h aumentou em 77% ( $P=0,003$ ) em relação ao grupo controle. O grupo exposto a 40% da CL50 apresentou aumento no escore médio em 127% de danos em relação ao controle ( $P<0,001$ ); e o grupo exposto a 60% da CL50 apresentou aumento de 143 % no escore médio em relação ao controle ( $P<0,001$ ). Os grupos expostos não apresentaram diferença estatística entre si.

**Figura 42** - Escores de danos ao DNA, acessados pelo teste do cometa, de células vermelhas de *Brycon amazonicus* exposto a 20% da CL50;96 h ( $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), a 40% ( $14,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e a 60% ( $21,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

**Figura 43** - Escores de danos ao DNA, acessados pelo teste do cometa, de células hepáticas de *Brycon amazonicus* exposto a 20% da CL50;96 h ( $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ), a 40% ( $14,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e a 60% ( $21,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, por 96 horas. Linha cheia indica a mediana e linha pontilhada indica a média para  $n=15$ . Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P<0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela a autora.

# 6 Discussão

---

## 6.1 EXPERIMENTO I: Teste de toxicidade aguda (CL50;96h) e sinais de intoxicação

A cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, é considerada extremamente tóxica ao *B. amazonicus*, visto que a CL50;96 horas é menor que 0,1 mg L<sup>-1</sup> (ZUCKER, 1985).

As causas da toxicidade dos piretroides para peixes ainda estão sendo estudadas, mas sabe-se que a sensibilidade do sistema nervoso e os mecanismos de metabolização de piretroides são pontos-chave desta questão (COATS, 2008). Os peixes retêm os piretroides por mais tempo no organismo e parecem ser deficientes em carboxilesterases, responsáveis pela hidrólise destes compostos (DEMOUTE, 1989; BRADBURY; COATS, 1989; HAYA, 1989). O caráter lipofílico dos piretroides permite que eles sejam absorvidos com facilidade pelas brânquias, contribuindo para a alta sensibilidade dos peixes a estes compostos (VIRAN et al., 2003; KUMAR et al., 2011).

Em peixes, a toxicidade da cipermetrina pode variar de 0,4 µg L<sup>-1</sup> (BRADBURY; COAST, 1989) a 400 µg L<sup>-1</sup> (KUMAR et al., 2009) como mostrado na Tabela 8. Essas diferenças podem ser atribuídas a alguns fatores tais como: o estágio de desenvolvimento do animal, a formulação comercial, a estereoquímica da molécula ou até mesmo as características espécie-específicas. Além disso, a solubilidade dos piretroides na água, que está muito relacionada com o solvente, pode interferir em sua toxicidade (SAHA; KAVIRAJ, 2008). Cada forma isomérica do piretroide possui uma toxicidade específica e a maioria das formulações comerciais tem uma razão isomérica fixa (KUMAR et al., 2011). A diferença na toxicidade é observada para quatro formas isoméricas de fenvalerato em *D. rerio* (MA et al., 2009); para a  $\gamma$ -cialotrina e  $\lambda$ -cialotrina em camarão *Macrobrachium nipponensis* (WANG et al. 2007); e para *cis*-cipermetrina e *trans*-cipermetrina em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (EDWARDS et al., 1987). Essas diferenças entre as CL50;96h para o mesmo princípio ativo reforça a importância de caracterizar o potencial tóxico de formulações comerciais à base de piretroides em espécies nativas. Essas medidas poderão contribuir para a estimativa do risco ambiental de piretroides comerciais específicos.

**Tabela 8** - Toxicidade aguda para espécies de peixes expostas à cipermetrina por 96 horas.

| <b>Espécie</b>                  | <b>CL50 (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b> | <b>Referência</b>      |
|---------------------------------|---|------------------------|
| <i>S. erythroptalmus</i>        | 0,4   | Bradbury; Coats (1989) |
| <i>Cyprinus carpio</i>          | 0,9   | Bradbury; Coats (1989) |
| <i>Salmo trutta</i>             | 1,2   | Bradbury; Coats (1989) |
| <i>Tilapia nilotica</i>         | 2,2   | Bradbury; Coats (1989) |
| <i>Heteropneustis fossilis</i>  | 7,2   | Mishra et al. (2005)   |
| <i>Poecilia reticulata</i>      | 9,43  | Yılmaz et al. (2004)   |
| <b><i>Brycon amazonicus</i></b> | <b>36</b>                                     | <b>Presente estudo</b> |
| <i>Labeo rohita</i>             | 139   | Das; Mukherjee (2003)  |
| <i>Rhamdia quelen</i>           | 193   | Borges et al. (2007)   |
| <i>Channa punctatus</i>         | 400   | Kumar et al. (2009)    |

Fonte: Elaborado pela a autora.

Os sinais de intoxicação observados em *B. amazonicus* durante o teste de toxicidade aguda da cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, indicam asfixia e danos neurológicos. Os peixes *C. batrachus*, *R. quelen* e *C. carpio* expostos a  $\lambda$ -cialotrina, cipermetrina e fenvalerato, respectivamente, apresentam hiperatividade, perda de equilíbrio e aumento do batimento opercular (KUMAR et al., 2011; BORGES et al., 2007; REDDY et al., 1992) como indícios de danos neurológicas e branquiais.

Estas alterações são comumente relatadas em animais expostos à piretroides e incluem tremores, perda de equilíbrio e letargia (WERNER; MORAN, 2008). *R. quelen* exposto a concentrações subletais de cipermetrina (BORGES et al., 2007) apresenta sinais de intoxicação similares ao *B. amazonicus*. Perda de coloração também é observada em *R. quelen* exposto a cipermetrina (MONTANHA et al., 2012). A espécie *C. batrachus* apresenta hiperatividade, perda de equilíbrio, convulsões e aumento do batimento opercular quando exposta à  $\lambda$ -cialotrina (KUMAR et al., 2011). Por outro lado, *C. batrachus*, contrário ao observado em *B. amazonicus*, apresenta escurecimento da pele (KUMAR et al. 2011). Aumento do batimento opercular também é relatado em *C. carpio* exposta ao fenvalerato (REDDY et al., 1992) e à cipermetrina (SUVETHA et al., 2010).

A exposição aguda, quando não leva à mortalidade, pode levar os animais a um aumento da suscetibilidade aos predadores, como ocorre com truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* exposta à deltametrina, cujo desempenho natatório fica reduzido (GOULDING et al., 2013). As injúrias provocadas por concentrações subletais de cipermetrina, bem como outros piretroides, tem importância ecológica e podem provocar danos em nível de população. Outros prejuízos em longo prazo podem ser apontados, tais como danos à reprodução, menor sobrevivência e crescimento. Jaensson et al. (2007) verificaram alterações no comportamento de corte de truta marrom *Salmo trutta* exposta à cipermetrina. *O. mossambicus* apresenta redução do crescimento, da taxa de alimentação, de absorção e da taxa metabólica quando exposta à deltametrina, na formulação Decis<sup>®</sup> (VIJAYAVEL; BALASUBRAMANIAN, 2007).

Os inseticidas piretroides apresentam baixa solubilidade em água, baixa persistência e adsorvem com facilidade ao material particulado (RASMUSSEN et al., 2008; BAJET et al., 2012), o que diminui a sua toxicidade em condições naturais. Contudo, o Galgotrin<sup>®</sup> é altamente tóxico mesmo em baixas concentrações, colocando em risco organismos aquáticos que não são alvos desse inseticida. Espera-se, portanto, que o presente conjunto de resultados contribua para a avaliação do risco ambiental de piretroides que atingem a água.

Quanto à legislação vigente, é recomendado que outros testes toxicológicos para diferentes piretroides sejam realizados em outras espécies nativas, que não são alvos do inseticida. Dessa forma, limites mais rigorosos e apropriados às formulações comerciais com piretroides poderão ser estabelecidos para o ambiente aquático. Além disso, o manuseio correto e a forma de tratamento dos resíduos, provenientes da agricultura, controle de vetores e parasitas em peixes, devem ser feitos com cautela e de forma sustentável a fim de se evitar a contaminação hídrica.

## **6.2 EXPERIMENTO II: Exposição subletal ao Galgotrin<sup>®</sup> por 96 horas**

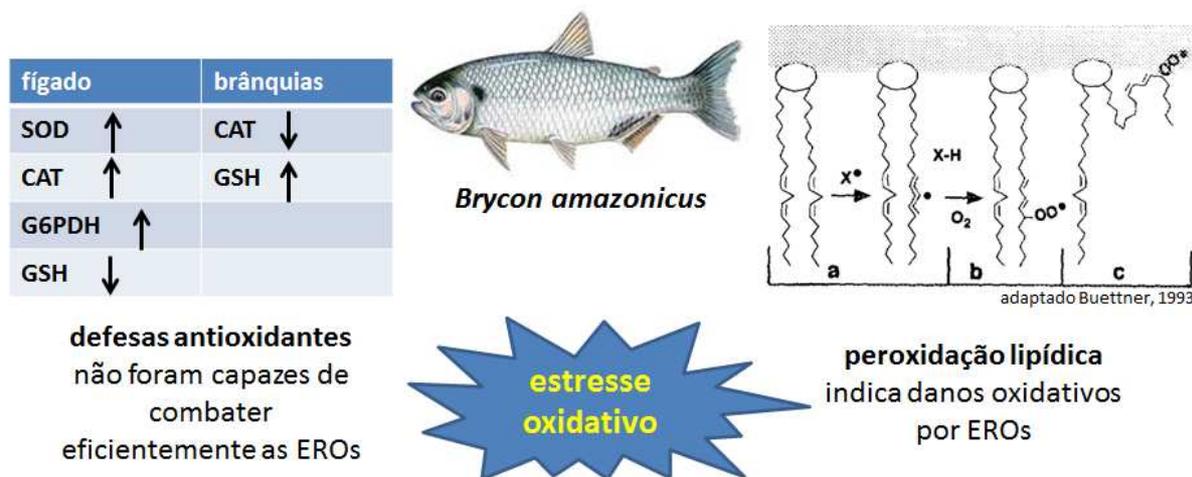
### **6.2.1 Balanço redox**

O estresse oxidativo é um fenômeno complexo, de difícil investigação e é um dos importantes mecanismos envolvidos na toxicidade celular (DI GIULIO; MEYER, 2008). Quando a concentração dos oxidantes aumenta ou a dos antioxidantes diminui, o estresse oxidativo ocorre e ocasiona uma série de danos celulares (GUTTERIDGE, 1995; KELLY et

al., 1998). Um dos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (ERO) é a peroxidação lipídica (LPO), que tem sido considerada o biomarcador do estresse oxidativo mais consistente (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008). Em *B. amazonicus* exposto à cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, verificamos elevados níveis de LPO em brânquias e fígado. Os elevados níveis de LPO indicam aumento de ERO e consequente estresse oxidativo nestes tecidos. A maior alteração de LPO foi observada nas brânquias, que são um dos primeiros órgãos a serem afetados pelo tóxico e que participam da absorção de xenobióticos, junto com a pele e o trato gastrointestinal (KLEINOW et al., 2008). Outras espécies de peixes apresentam níveis elevados de LPO induzidos pela exposição à piretroides em diferentes tecidos (SAYEED et al., 2003; SEPICI-DINÇEL et al., 2009; ANSARI et al., 2011; PINER; ÜNER, 2012; ENSIBI et al., 2013). Os elevados níveis de LPO podem ser tóxicos às células. Os maiores danos decorrentes da LPO são a desestabilização das membranas de organelas, redução do potencial de membrana, extravasamento de enzimas lisossomais no citosol, aumento da permeabilidade da membrana celular a H<sup>+</sup> e íons, diminuição de sua fluidez e inibição de enzimas ligadas à membrana (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008). Subprodutos da LPO, como o malonaldeído (MDA), podem ainda formar adutos de DNA, ao seu ligar a ele (CARVALHO, 2001).

O estresse oxidativo verificado em fígado e brânquias de *B. amazonicus* é resultado de um sistema antioxidante que, embora responsivo, não foi capaz de combater eficientemente as espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 44). O estudo das alterações no sistema antioxidante é importante para a compreensão do balanço redox e da adaptação ou compensação dos mecanismos responsáveis por combater as ERO em situação estressora (REGOLI, 2000).

**Figura 44** - Representação gráfica da compensação do sistema antioxidante de brânquias e fígado de *B. amazonicus* exposto a  $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$  de cipermetrina, na formulação Galgotrin®. Apesar de o sistema antioxidante responder à condição adversa, houve um aumento de hidroperóxidos de lipídeos, que caracterizou o estresse oxidativo nos mesmos. ERO = espécies reativas de oxigênio; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; G6PDH = glicose 6-fosfato desidrogenase; GSH = glutationa;  $X^\bullet$  = radical livre.



Fonte: Elaborado pela a autora.

Embora o fígado não seja o primeiro órgão a entrar em contato com o tóxico, ele é um dos mais injuriados por xenobióticos por ser o principal órgão na biotransformação. A metabolização de xenobióticos é um fator importante na hepatotoxicidade, pois o composto original ou os subprodutos gerados na metabolização podem se ligar covalentemente a proteínas, DNA ou RNA (HINTON et al., 2008). Além disso, o ciclo redox é um dos mecanismos mais comuns na geração de ERO, especialmente  $O_2^{\bullet-}$ , e demanda muito NADPH (DI GIULIO; MEYER, 2008). A toxicidade dos piretroides em peixes pode estar relacionada à sua biotransformação, já que os peixes retêm estes compostos por mais tempo no organismo (DEMOUTE, 1989; HAYA, 1989; COATS, 2008). Dessa forma, o aumento das ERO no fígado de *B. amazonicus* pode ser oriundo dos processos de metabolização do Galgotrin®.

A superóxido dismutase (SOD) é uma importante enzima na redução do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) enquanto que a CAT reduz o  $H_2O_2$ , produto da reação da SOD. A interação cooperativa destas duas enzimas protege a célula dos danos oxidativos (KONO;

FRIDOVICH, 1982). Dessa forma, é evidente que as atividades da SOD e CAT aumentadas no fígado de *B. amazonicus* deveram-se à ação mútua para combater as ERO nas células hepáticas. O aumento da atividade destas enzimas pode ainda estar relacionado ao aumento da expressão gênica, como relatado em fígado de *D. rerio*, exposto à cipermetrina por 96 horas (JIN et al., 2011). Apesar deste mecanismo de proteção, as ERO podem formar o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), pela reação de Fenton e Haber-Weiss. O  $\cdot\text{OH}$  é o mais reativo e tóxico às biomoléculas e ataca os ácidos graxos poliinsaturados para iniciar a LPO (GUTTERIDGE, 1995). Este fato explica os elevados níveis de LPO no fígado de *B. amazonicus*, apesar da indução da SOD e CAT neste tecido.

O estresse oxidativo induzido por agrotóxicos pode também estar relacionado à inativação de enzimas antioxidantes e, conseqüentemente, à redução do potencial antioxidante celular (LUSHCHAK, 2011). O sistema antioxidante das brânquias e do rim de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin<sup>®</sup> apresentaram alterações mais brandas se comparados ao fígado. Cabe saber se isso ocorreu porque o potencial antioxidante destes tecidos é naturalmente baixo ou se a exposição ao inseticida reduziu a sua capacidade antioxidante. Como o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pode inibir a CAT *in vitro* (KONO; FRIDOVICH, 1982), é possível que a redução da atividade da CAT em brânquias e rim de *B. amazonicus* seja conseqüência do aumento de ERO nestes tecidos. A redução da atividade da CAT em rim e brânquias também é observada em *C. punctatus* exposta à deltametrina (SAYEED et al., 2003). Contudo, Ensibi et al. (2013) relata aumento da atividade da CAT para *C. carpio*, após 96 horas de exposição à deltametrina.

A glutaciona peroxidase (GPx) não sofreu alteração nos tecidos avaliados. A não indução da GPx pode ter contribuído para os elevados níveis de LPO em fígado e brânquias, pois esta enzima é responsável por combater não apenas o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mas também hidroperóxidos de lipídios, desde que não estejam esterificados à membrana (DI GIULIO; MEYER, 2008). A GPx hepática de *O. niloticus* igualmente não altera frente ao estresse oxidativo induzido por  $\lambda$ -cicalotrina (PINER; ÜNER, 2012).

A glutaciona (GSH) é um antioxidante não enzimático crucial no combate às ERO (DI GIULIO; MEYER, 2008). Além disso, alguns agrotóxicos podem induzir o estresse oxidativo por se ligarem diretamente a GSH, reduzir a sua reserva e, conseqüentemente, o potencial antioxidante celular (LUSHCHAK, 2011). Assim, a redução na concentração de GSH no fígado de *B. amazonicus* indica que este antioxidante foi recrutado no combate às ERO. A depleção de GSH hepático de *B. amazonicus* pode estar relacionada à indução da G6PDH

neste tecido, cujo aumento da atividade indica maior produção de NADPH, importante na regeneração de GSH a partir de glutathiona dissulfeto (GSSG). A produção de NADPH pelo fígado pode ainda estar relacionada ao ciclo redox que, como dito anteriormente, demanda muito deste equivalente redutor e é um dos principais mecanismos de geração de ERO induzida por xenobióticos (DI GIULIO; MEYER, 2008). Nas brânquias, o aumento de GSH sugere que a produção deste tripeptídeo foi estimulada por uma depleção inicial após a exposição. Ao contrário do encontrado neste estudo, *C. punctatus* e *O. niloticus* expostas à deltametrina e  $\lambda$ -cialotrina, respectivamente, apresentam aumento de GSH em fígado para combater os oxidantes (SAYEED et al., 2003; PINER; ÜNER, 2012).

O ácido ascórbico é um potente agente redutor capaz de se ligar às ERO e regenerar a vitamina E a partir do radical  $\alpha$ -tocoferil (KELLY et al., 1998; DI GIULIO; MEYER, 2008). O aumento da concentração de ácido ascórbico no cérebro de *B. amazonicus* foi um mecanismo protetor deste tecido frente à neurotoxicidade do Galgotrin<sup>®</sup>, que será discutida na seção 6.2.4. O cérebro possui uma alta concentração de ácido ascórbico e um eficiente sistema de captação desta molécula. Outros órgãos capazes de armazenar ácido ascórbico, como o rim e as glândulas adrenais, podem liberar esta molécula no sangue para fornecê-la ao cérebro, mantendo a alta concentração, apesar das variações no organismo (REBEC; PIERCE, 1994).

Dessa forma, o estresse oxidativo induzido pelo Galgotrin<sup>®</sup>, indica que o sistema antioxidante de *B. amazonicus*, embora responsivo, não foi capaz de combater eficientemente as ERO em fígado e brânquias. A deficiência do sistema antioxidante e a LPO parecem ser mecanismos adicionais que potencializam a toxicidade dos piretroides em peixes, mesmo em baixas concentrações.

Estes resultados contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos de ação que norteiam a toxicidade dos piretroides em peixes. Além disso, as respostas de *B. amazonicus* frente à exposição ao Galgotrin<sup>®</sup> nos chamam a atenção pela baixa concentração a que esta espécie foi exposta ( $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$  de cipermetrina) e pelo curto período de tempo de exposição. Infelizmente, os piretroides podem ser encontrados no ambiente aquático em concentrações similares ou até maiores do que aquela utilizada neste trabalho (MARINO; RONCO, 2005; BELLUTA et al., 2010), quer como resultado da lixiviação ou escoamento de aplicações agrícolas, quer pela aplicação direta do inseticida em sistemas de criação de peixes (HART et al., 1997; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2003). Assim, estes resultados reforçam a necessidade de uma melhor regulamentação de piretroides nos ecossistemas aquáticos, inclusive no Brasil.

## 6.2.2 Histopatologias de brânquias

As brânquias são bons indicadores da qualidade da água e bons modelos para estudos de impacto ambiental, pois são uma das principais rotas de entrada de agrotóxicos (VELMURUGAN et al., 2007).

Os animais expostos a 20% da CL50;96h de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, apresentaram alterações histológicas com dois vieses: alterações indicativas de mecanismos de defesa (como a proliferação de células cloreto - CC e dilatação dos vasos sanguíneos) e alterações indicativas de danos ao órgão (como os aneurismas e hemorragias). O índice de alteração histopatológica (IAH) demonstra que as alterações nas brânquias de *B. amazonicus* são moderadas a severas, assim como ocorre para *O. niloticus* exposta à cipermetrina (KORKMAZ et al., 2009) e para lebiste *Lebistes reticulatus* exposto à zeta-cipermetrina (ÇALISKAN et al., 2003).

Em alguns casos, os animais controle e os animais expostos apresentaram a mesma frequência de alterações, como as agrupadas em “hiperplasia e hipertrofia do epitélio”. Estas alterações devem-se, possivelmente, ao confinamento dos animais em um sistema estático (sem renovação da água) por 96 horas.

Nas brânquias dos animais expostos ao Galgotrin<sup>®</sup>, observaram-se alterações nos vasos sanguíneos, como dilatação vascular, aneurismas e hemorragias. A dilatação dos vasos sanguíneos foi a alteração mais evidente e pode ter sido provocada pelo efeito de catecolaminas, comumente liberadas em condição de estresse (PICKERING; POTTINGER, 1995). As catecolaminas aumentam a perfusão lamelar a fim de aumentar a captação de oxigênio para os tecidos; entretanto, o aumento da perfusão pode provocar aumento da permeabilidade de íons pelas brânquias (PICKERING; POTTINGER, 1995; PERRY, 1997; BONGA; LOCK, 2008).

Embora a dilatação dos vasos sanguíneos seja uma alteração adaptativa do animal, ela pode ter dado início a outras alterações nos vasos de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin<sup>®</sup>, como os aneurismas e hemorragias, que são danosas e de estágio II. Dilatação dos vasos sanguíneos e aneurismas são relatados para *A. dispar* exposto a deltametrina (ALGHANBOUSI et al., 2012); aneurismas na lamela secundária e hiperplasia do epitélio branquial são observados em *C. carpio* exposta a ciflutrina (SEPICI-DINÇEL et al., 2009); aneurismas na lamela secundária, hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar, fusão lamelar e

necrose são relatados em *O. niloticus* exposta a cipermetrina (KORKMAZ et al., 2009) e em *C. mrigala* exposta a  $\lambda$ -cialotrina (VELMURUGAN et al., 2007); e hiperplasia do epitélio branquial, descolamento do epitélio e fusão lamelar são relatados para *O. niloticus* como mecanismo de defesa frente a exposição à deltametrina (KAN et al., 2012).

Para compensar o aumento da permeabilidade (saída) de íons e água, algumas alterações morfofuncionais ocorreram em *B. amazonicus*, como hipertrofia e hiperplasia de CC, também relatada para *A. dispar* exposto à deltametrina por 96 horas (AL-GHANBOUSI et al., 2012). A proliferação de CC é uma resposta comum em condições de estresse e tem a função de restabelecer o balanço iônico, visto que o epitélio branquial eleva sua capacidade de reabsorção de íons (PERRY, 1997; EVANS et al., 2005). A hiperplasia de CC foi mais frequente nos animais expostos e é um mecanismo de defesa do animal, pois ela aumenta a espessura lamelar e dificulta a entrada do inseticida no organismo. Por outro lado, o aumento da “barreira água-sangue” prejudica as trocas gasosas nas brânquias, visto que a distância de difusão fica aumentada (PERRY, 1997). A dilatação dos vasos sanguíneos observada em *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin<sup>®</sup> pode ser devida ao aumento da barreira lamelar. Dessa forma, a dilatação nos vasos sanguíneos nas brânquias de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin<sup>®</sup> pode ser decorrente do efeito de catecolaminas e/ou do efeito compensatório à hiperplasia e hipertrofia de CC.

Além disso, não se descarta a hipótese de que as alterações morfológicas observadas nas brânquias de *B. amazonicus* possam ser resultantes do efeito direto do Galgotrin<sup>®</sup> neste órgão. Os piretroides são inseticidas lipofílicos e podem ser absorvidos facilmente pelas brânquias (VIRAN et al., 2003; KUMAR et al., 2011). Al-Ghanbousi et al. (2012) relatam necrose severa nas células pilares de *A. dispar* exposto à deltametrina e defendem que este dano pode ser resultado do contato direto do piretroide com as brânquias. Korkmaz et al. (2009) afirmam que as alterações na lamela secundária de *O. niloticus* exposto à cipermetrina podem ser atribuídas ao contato direto do piretroide com as brânquias.

Os animais controle apresentaram maior frequência de células mucosas e de células mucosas vazias. A profusão de muco é um mecanismo de defesa, que minimiza o efeito irritante do xenobiótico sobre as brânquias (VERMA et al., 1980; PICKERING; POTTINGER, 1995; KAN et al., 2012). Entretanto, o excesso de muco, assim como a hiperplasia de CC, podem dificultar as trocas gasosas. A menor frequência de células mucosas em *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin<sup>®</sup> pode ter facilitado a entrada do inseticida no animal. Diferente do relatado para *B. amazonicus*, as espécies *O. niloticus* e *A. dispar* expostas à

deltametrina apresentam maior número de células mucosas e de muco quando comparado ao controle (AL-GHANBOUSI et al., 2012; KAN et al., 2012).

### 6.2.3 Balanço iônico e variáveis hematológicas

Coats (2008) relata que um dos mecanismos secundários de ação de piretroides em peixes é a interferência na atividade de ATPases responsáveis por manter o balanço iônico, principalmente as  $\text{Ca}^+$ -ATPases. Dessa forma, as desordens osmorregulatórias passam a contribuir para a alta toxicidade de piretroides para peixes e necessitam de melhores investigações.

O caráter lipofílico dos piretroides pode contribuir para as alterações das trocas iônicas e gasosas no epitélio branquial. Para Suvetha et al. (2010), a natureza lipofílica dos piretroides altera a fluidez da fase lipídica da membrana celular; as interações hidrofóbicas entre proteínas e lipídios parecem alterar as configurações das proteínas que controlam a permeabilidade de membrana, afetando assim a sua taxa de transporte e atividade enzimática.

Em *B. amazonicus*, observamos aumento da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas brânquias dos animais expostos. O contato do inseticida com as brânquias pode ter provocado lesões neste tecido, que respondeu com a proliferação de CC, como discutido na seção 6.2.2. Como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é abundante neste tipo celular, observamos um aumento na atividade enzimática.

Sabendo-se que a proliferação das CC aumenta a reabsorção aos íons (PERRY, 1997), o aumento da concentração de  $\text{Na}^+$  plasmático pode ser resultante do aumento da atividade da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase das CC, constatado neste estudo, e do aumento do influxo de  $\text{Na}^+$  pelas células pavimentosas, via aumento da atividade de  $\text{H}^+$ ATPases. Conforme apresentado na seção 2.5.2, ambas as enzimas são estimuladas por cortisol, um dos principais hormônios liberados no estresse. A fim de buscar o equilíbrio eletrolítico, houve maior reabsorção de  $\text{Cl}^-$  pelas CC. Embora o cortisol plasmático não tenha sido quantificado neste estudo, sabe-se que peixes expostos a piretroides apresentam aumento de cortisol plasmático, como relatado para *C. carpio* exposto a ciflutrina (SEPICI-DINÇEL et al., 2009) e para *O. mykiss* exposto à  $\lambda$ -cicalotrina (VENTURINI). Além disso, o aumento da concentração de glicose plasmática em *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin<sup>®</sup> é uma resposta clássica de estresse, que ocorre após a liberação de cortisol e confirma a condição estressora enfrentada pelo animal.

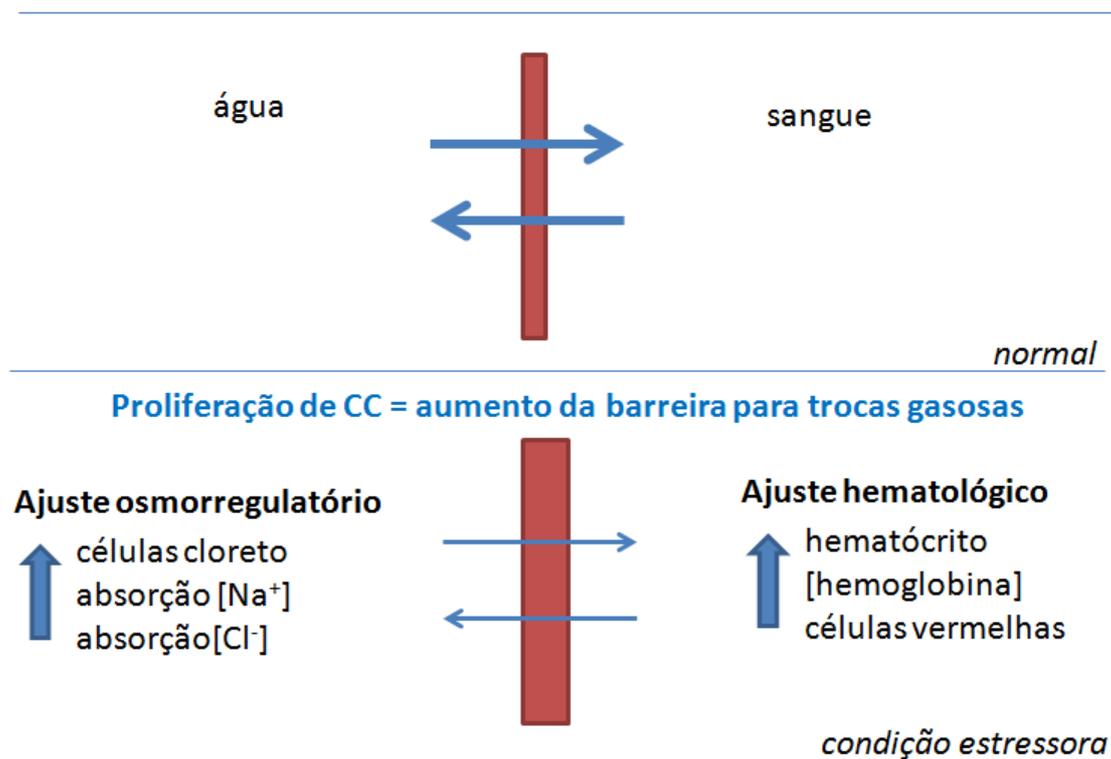
O aumento da LPO, discutido na seção 6.2.1, pode ter contribuído para as alterações osmorregulatórias de *B. amazonicus*. Os radicais livres podem desestabilizar a membrana celular e, conseqüentemente, reduzir o seu potencial de membrana, aumentar a permeabilidade celular a  $H^+$  e íons, diminuir a sua fluidez e alterar as enzimas ligadas a ela (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008).

Assim como ocorreu com *B. amazonicus*, *R. quelen* apresenta aumento da concentração de íons ( $Na^+$ ,  $P$ ,  $K^+$  e  $Mg^{++}$ ) plasmáticos quando exposto à cipermetrina (BORGES et al., 2007). No entanto, redução de  $Na^+$  e  $Cl^-$  e inibição da  $Na^+/K^+$ -ATPase é relatado para *C. carpio* exposta à cipermetrina, como resultado da falha no sistema de osmorregulação e atuação direta do piretroide sobre a ATPase (SUVETHA et al., 2010). Aumento do número de CC é observado também em *A. dispar* exposto à deltametrina (ALGHANBOUSI et al., 2012).

Bonga e Lock (2008) alertam para o fato de que os efeitos de contaminantes em experimentos *in vivo* podem gerar dois processos, que interferem entre si: a ação tóxica direta dos produtos químicos sobre os mecanismos de transporte de íons e as respostas compensatórias do peixe. Esta interferência atrapalha a análise dos efeitos tóxicos do xenobiótico, pois as respostas compensatórias recrutam muita energia e acabam superestimando o impacto sobre o organismo, já que podem afetar o crescimento e a sobrevivência do animal. Por outro lado, as respostas compensatórias podem camuflar os mecanismos de ação da droga. É comum não se observar inibição da atividade da  $Na^+/K^+$ -ATPase quando se tem proliferação de CC. Isso explica as diferentes respostas osmorregulatórias de peixes expostos a piretroides.

Como a proliferação de CC está intimamente relacionada ao aumento da espessura lamelar para difusão de gases, alguns mecanismos hematológicos foram recrutados para minimizar os efeitos deste ajuste osmorregulatório sobre as trocas gasosas. O aumento de células vermelhas e da concentração de hemoglobina, relatado neste estudo, parece ser um ajuste fisiológico de *B. amazonicus* a esta condição. Dessa forma, as respostas osmorregulatórias e hematológicas de *B. amazonicus* parecem estar relacionadas, como apresentado na Figura 45.

**Figura 45** - Representação gráfica dos ajustes osmorregulatórios e hematológicos de *B. amazonicus* exposto à cipermetrina, na formulação Galgotrin®. O retângulo vermelho representa uma lamela branquial. As setas representam as trocas gasosas. CC = célula cloreto. A condição estressora pode provocar a proliferação de CC e, conseqüentemente, o aumento da reabsorção de íons, bem como da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. O aumento da atividade de H<sup>+</sup>-ATPases em células pavimentosas pode resultar em aumento do fluxo de Na<sup>+</sup>. Como as trocas gasosas ficam prejudicadas com o aumento da barreira lamelar, alguns ajustes hematológicos foram ativados, como o aumento de células vermelhas e da concentração de hemoglobina, a fim de evitar hipóxia.



Fonte: Elaborado pela a autora.

Como o sangue é o meio fisiológico de transporte no organismo, que entra em contato direto com o contaminante e com diversos tecidos e órgãos, o estado fisiológico do animal pode se refletir em suas características hematológicas (SUVETHA et al., 2010).

O perfil hematológico de *B. amazonicus* indica um aumento de células vermelhas circulantes, resultantes de contração esplênica ou aumento da eritropoiese. Peixes em condições estressoras, como hipóxia e exercício severo, apresentam visível contração esplênica, redução no tamanho do baço e aumento de eritrócitos e hemoglobina circulantes, que aumentam a capacidade de transportar e fornecer oxigênio aos tecidos (YAMAMOTO et

al., 1985). Pickering e Pottinger (1995) relatam que o aumento de catecolaminas, comumente liberadas em condições de estresse, provoca uma rápida liberação de células vermelhas do baço de peixes. É provável que uma redução da oxigenação tecidual, provocada por alterações morfológicas nas brânquias, possa ter estimulado a produção ou a liberação de células vermelhas em *B. amazonicus*. Essa hipótese é sustentada pelas alterações morfológicas nas brânquias dos animais expostos, discutidas na seção 6.2.2.

Outros trabalhos confirmam a nossa hipótese, como o relatado para *H. fossilis* exposto à deltametrina, que apresenta quadro anêmico compensado pela eritropoiese (KUMAR et al., 1999); para *R. quelen*, que apresenta aumento na concentração de hemoglobina quando exposto à cipermetrina, na formulação Cypergold<sup>®</sup>, por 8 dias (BORGES et al., 2007); e para *A. multispinis*, que apresenta aumento de células vermelhas e aumento na concentração de hemoglobina quando intoxicado por deltametrina (PIMPÃO et al., 2007).

Por outro lado, alguns estudos relatam que o ajuste fisiológico para suprir a demanda de oxigênio nem sempre ocorre em peixes expostos a piretroides. Al-Ghanbousi et al. (2012) sugerem que os danos morfológicos observados nas brânquias de *A. dispar* exposto à deltametrina por 96 h podem ter reduzido a área de superfície das trocas gasosas e, conseqüentemente, levado a falência respiratória. *C. catla* exposta à cipermetrina por 60 dias apresenta alteração hematológica indicativa de anemia, resultante de hemólise ou de dano branquial (VANI et al., 2012). Saxena e Seth (2002) relatam redução do hematócrito, número de células vermelhas e de hemoglobina em *C. punctatus* exposta à cipermetrina por 30 dias.

Em síntese, a concentração de 7,2 µg L<sup>-1</sup> de cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, provocou ajustes osmorregulatórios e hematológicos relacionados em *B. amazonicus*.

#### 6.2.4 Neurotoxicidade

A cipermetrina é conhecida por sua eficácia contra uma série de pragas e age, principalmente, no sistema nervoso central (SNC). Por isso, é importante conhecer os efeitos desse piretroides em biomarcadores relacionados ao tecido nervoso. A acetilcolinesterase (AChE) está presente, principalmente, na fenda sináptica e nas junções neuromusculares de vertebrados. A AChE é responsável por inativar a acetilcolina (ACh), hidrolisando-a em acetato e colina. O modo de ação da AChE é a rápida remoção da ACh, controlando assim a transmissão colinérgica.

No presente estudo, observamos aumento da atividade da AChE muscular de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin®; no entanto, não foi verificada alteração da AChE cerebral após 96 h de exposição. *T. tinca* exposta por 60 dias a concentrações subletais de deltametrina igualmente não apresenta alteração da AChE cerebral (HERNÁNDEZ-MORENO et al., 2010), assim como *O. tsawytsha* exposto a concentrações subletais de fenvalerato, um piretroide do tipo I (WHEELLOCK et al., 2005).

Embora não tenhamos observado inibição da AChE cerebral *in vivo*, comumente relatada em peixes expostos a piretroides (REDDY et al., 1992; MUSHIGERI; DAVID, 2005; KUMAR et al., 2009) é provável que a AChE cerebral de *B. amazonicus* tenha sido inibida na exposição subletal, em momento anterior às 96 horas. Essa hipótese é suportada pelo ensaio *in vitro*, no qual observamos redução na atividade da AChE cerebral de *B. amazonicus* em até 65%. Bálint et al. (1995) relatam inibição mista *in vitro* da AChE cerebral de *C. carpio*, provocada por deltametrina e resultante da interação do piretroide com o sítio ativo da enzima ou com outra parte estrutural, que modifica o centro catalítico da mesma. Os inseticidas organofosforados (OP) interagem covalentemente com o sítio ativo da AChE, provocando uma inibição permanente (WILSON, 2001). Embora não possamos inferir sobre o tipo de inibição (reversível ou permanente) para o teste *in vitro*, esta inibição poderia provocar um acúmulo de ACh no SNC e nas junções neuromusculares de *B. amazonicus*, resultando em hiperexcitabilidade da transmissão colinérgica (Figura 46). Em resposta ao excesso de ACh, um mecanismo compensatório foi ativado: o aumento da atividade da AChE muscular, provavelmente resultante do aumento da expressão gênica desta enzima. A inibição da AChE cerebral e o aumento de sua expressão gênica é relatado em um híbrido de e (*Clarias gariepinus* x *Clarias macrocephalus*) exposto ao clorpirifós, um inseticida OP (SOMNUEK et al., 2009). A indução gênica da AChE parece ser uma resposta transcricional para reduzir a transmissão nervosa colinérgica, que fica exacerbada com a inibição colinesterásica provocada pelo OP (SOMNUEK et al., 2009).

**Figura 46** - Representação gráfica do mecanismo proposto para a inibição *in vitro* da AChE cerebral e o aumento *in vivo* da atividade da AChE muscular de *B. amazonicus* exposto ao Galgotrin®. +++ indica hiperexcitabilidade da transmissão nervosa no motoneurônio.



Fonte: Elaborado pela a autora.

Além disso, não se descarta a hipótese de inibição da AChE no músculo dos animais expostos, em momento anterior às 96h, e posterior aumento da atividade para compensar o acúmulo de ACh. Da mesma forma como descrito para cérebro, a síntese de novas enzimas poderia ocorrer para compensar a superestimulação colinérgica.

Esta alteração é um ajuste bioquímico, pois o acúmulo de ACh poderia gerar uma série de danos ao organismo. O aumento de ACh nas junções neuronais autonômicas do sistema simpático e parassimpático pode danificar a função de olhos, bexiga, coração e glândulas salivares, provocar miopatias transitórias (WILSON, 2001), contrações musculares prolongadas, resultando em paralisia e até morte (MUSHIGERI; DAVID, 2005). As alterações locomotoras observadas em *B. amazonicus* na exposição aguda reforçam a ideia de inibição da AChE no SNC.

Além disso, a literatura especializada reforça esta proposta, visto que a inibição da AChE por piretroides é relatada para muitas espécies de peixes. A cipermetrina reduz a atividade da AChE cerebral de *L. rohita*, mesmo após 15, 20 e 45 dias de exposição (DAS; MUKHERJEE, 2003). O fenvalerato inibe a AChE em cérebro, brânquias, músculo e fígado de *C. mrigala* (MUSHIGERI; DAVID, 2005) e *C. carpio* (REDDY et al., 1992). Em *C. carpio*, Szegletes et al. (1995) relatam que há diferentes isoformas da AChE na espécie e sugerem que a deltametrina possa alterar a distribuição das isoformas de AChE, mesmo sem alterar a sua atividade. A espécie *C. punctatus*, exposta a concentrações subletais de  $\lambda$ -

cialotrina e cipermetrina, apresenta reduções significativas na atividade da AChE cerebral, muscular e branquial (KUMAR et al., 2009).

Outros estudos mostram que os piretroides podem interferir na transmissão colinérgica por outros mecanismos. Houssain et al. (2004) propõem que os piretroides sejam capazes de modular a liberação de acetilcolina no hipocampo de ratos sem, contudo, alterar a atividade da AChE cerebral.

Apesar das evidências encontradas neste estudo e dos trabalhos relatados, mais estudos são necessários e estão em andamento para confirmar esta proposta.

### **6.3 EXPERIMENTO III: Exposição subletal ao Galgotrin® por 96 horas – Avaliação da genotoxicidade**

A cipermetrina, na formulação Galgotrin®, é genotóxica às células vermelhas e aos hepatócitos de *B. amazonicus*. Como os danos no DNA das células vermelha e nos hepatócitos, acessado pelo teste do cometa, aumentaram significativamente ( $P < 0,05$ ), de acordo com as concentrações de Galgotrin®, podemos afirmar que existe uma relação concentração-resposta. A resposta é mais evidente do tecido sanguíneo, que entrou em contato direto com o inseticida, e antes do tecido hepático.

O efeito clastogênico de piretroides é relatado para peixes. A cipermetrina é genotóxica para curimba *Prochilodus lineatus*, cujas células vermelhas apresentam danos no DNA, evidenciados pelo teste do cometa (SIMONIELLO et al., 2009), e para hepatócitos de *D. rerio*, cujos danos ao DNA são concentração-dependentes para a frequência e intensidade dos “cometas” (JIN et al., 2011). Ansari et al., (2011) afirmam que a  $\lambda$ -cialotrina tem potencial clastogênico em *C. punctatus*, e relacionam o efeito genotóxico do piretroide aos ataques oxidativos das ERO. Estes autores constataram aumento de micronúcleos (MN) e de peroxidação lipídica (LPO) em células vermelhas, e aberrações cromossômicas (como quebra de cromossomos e cromátides) em células renais. *O. niloticus* apresenta aumento na frequência de MN em células vermelhas quando exposta à deltametrina (KAN et al., 2012).

Os mecanismos da genotoxicidade da cipermetrina ainda estão sendo estudados. A natureza hidrofóbica e o tamanho reduzido da molécula permitem que a cipermetrina atravesse as membranas com facilidade e assim atinja o DNA, no núcleo da célula (SAXENA et al., 2005; HUSSIEN et al., 2013). Uma vez dentro do núcleo, a porção ácida da cipermetrina pode interagir diretamente com o DNA, via polarização, desestabilizar a

estrutura da dupla hélice, desenrolando-a e assim induzir aos danos cromossômicos (SAXENA et al., 2005). Saxena et al. (2005) afirmam que a cipermetrina tem forte potencial clastogênico, visto as aberrações cromossômicas e mitóticas em células de meristema de *Allium sativum* expostas à cipermetrina por 24 horas e após a recuperação de 24 horas. Estes autores confirmam a interação direta da cipermetrina com o DNA, embora ainda não esteja claro se os metabólitos da biotransformação do piretroide interagem com o DNA também (SAXENA et al., 2005).

Além do efeito direto, a genotoxicidade dos piretroides parece ser induzida pelo estresse oxidativo, como relatado para *D. rerio* (JIN et al., 2011), *C. punctatus* (ANSARI, et al., 2011) e *O. niloticus* (KAN et al., 2012). Entende-se que o estresse oxidativo está diretamente relacionado aos danos no DNA, pois as espécies reativas de oxigênio (ERO) podem oxidar os lipídios, as proteínas e o DNA (GUTTERIDGE, 1995). As ERO podem oxidar as bases nitrogenadas do DNA, levando à formação de quebras em uma das cadeias de DNA (quebras simples) ou quebras simples em posições aproximadamente assimétricas nas duas cadeias do DNA (quebras duplas) (BERRA et al., 2006). Os produtos da LPO podem ainda formar adutos de DNA (CARVALHO, 2001), os quais podem desestabilizar a dupla hélice. Conforme discutido na seção 6.2.1, o Galgotrin<sup>®</sup> provocou estresse oxidativo em *B. amazonicus*, visto o aumento de LPO hepático e branquial e as alterações no sistema antioxidante. Estas alterações reforçam a hipótese de que as ERO podem ter contribuído para a genotoxicidade do Galgotrin<sup>®</sup>, especialmente no fígado, onde se observou aumento de LPO. Dessa forma, a genotoxicidade da cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, em células vermelhas e hepatócitos pode ser resultante 1) do efeito direto do inseticida no DNA e/ou 2) dos ataques oxidativos provocados pelas ERO, visto as evidências de estresse oxidativo.

Jha (2008) relata que as alterações no DNA que ocorrem em células somáticas podem provocar doenças potencialmente carcinogênicas e anormalidades morfológicas, que afetam o *fitness*, a adaptabilidade e a sobrevivência do animal. Assim, as alterações no DNA relatadas para *B. amazonicus* podem implicar em danos ecológicos à espécie e alertam para a necessidade de outros estudos, principalmente com avaliações em longo prazo.

# 7 Conclusões

---

- a. O valor de CL50;96h indica que a cipermetrina, na formulação Galgotrin<sup>®</sup>, é extremamente tóxica ao *B. amazonicus*, segundo a classificação de Zucker (1985), amplamente aceita em toxicologia aquática;
- b. O Galgotrin<sup>®</sup> causou estresse oxidativo em fígado e brânquias de *B. amazonicus* exposto a 20% da CL50;96h, por 96 horas;
- c. O Galgotrin<sup>®</sup> causou ajustes osmorregulatórios e hematológicos em *B. amazonicus* exposto a 20% da CL50;96h, por 96 horas. Estes ajustes estão, provavelmente, relacionados;
- d. O Galgotrin<sup>®</sup> causou alterações histopatológicas em *B. amazonicus* exposto a 20% da CL50;96h, por 96 horas, com dois vieses: mecanismos de defesa e danos ao órgão;
- e. O Galgotrin<sup>®</sup> causou ajuste bioquímico na AChE muscular de *B. amazonicus* exposto a 20% da CL50;96h, por 96 horas. O teste *in vitro* confirmou a neurotoxicidade do Galgotrin<sup>®</sup> a AChE cerebral, que não foi observada *in vivo*.
- f. O Galgotrin<sup>®</sup> foi genotóxico para hepatócitos e células vermelhas de *B. amazonicus* exposto a concentrações subletais, por 96 horas.

Os efeitos deletérios, evidenciados principalmente no DNA e nas membranas celulares de *B. amazonicus* exposto a concentrações subletais de Galgotrin<sup>®</sup>, alertam para o fato de que baixas concentrações de Galgotrin<sup>®</sup> podem provocar danos com implicações ecológicas, as quais podem se estender em longo prazo.

# Referências

---

ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v.10, n.6, p.141-147, 2004.

ADHIKARI, S. et al.. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.58, n.2, p.220-226, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Consulta Pública nº 64**, de 11 de Julho de 2007, Disponível em <<http://www4.ANVISA.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B19072-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 31/08/2010.

AL-GHANBOUSI, R.; BA-OMAR, T.; VICTOR, R. Effect of deltamethrin on the gills of *Aphanius dispar*: A microscopy study. **Tissue and Cell**, v. 44, p.7-14, 2012.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard methods for examination of water and wastes**. 12. ed. Washington, DC: Joint Editorial Board, 1980.

ANSARI, R. A., et al. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish. *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p.150-156, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NBR 15515-2**: passivo ambiental em solo e água subterrânea, 2011. 19 p.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2003. 322p.

BADIOU, A.; BELZUNCES, L.P. Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? a study case with deltamethrin. **Chemico-Biological Interactions**, v.175, p. 406-409, 2008.

BAJET, C.M. et al. Toxicological assessment of pesticides used in the Pagsanjan-Lumban catchment to selected non-target aquatic organisms in Laguna Lake. **Agriculture Water Management**, v.106, p.42-49, 2012.

BÁLINT, T. et al. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidation and the pyrethroid deltamethrin. **Aquatic Toxicology**, v.33, p. 279-295, 1995.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, p. 3-26, 1991.

BELLUTA, I. et al. Avaliação Temporal e espacial no córrego do Cintra (Botucatu-SP) frente aos defensivos agrícolas e parâmetros físico-químicos de qualidade de água – um estudo de caso. **Revista Energia na Agricultura**, v.25, p.54-73, 2010.

BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Disease**, v.22, p.25-34, 1999.

BERRA, C.; MENCK, C.F.M.; MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1340-1344, 2006.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: manual of biochemical methods**. 3. ed. Grune e Stratton, INC, 1984. 187p.

BONGA, S.E.W; LOCK, R.A.C. The osmoregulatory system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. (Ed.). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRR Press, Taylor and Francis Group, 2008. p.401-416

BORGES, A. et al. Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. **Chemosphere**, v.69, p.920-926, 2007.

BRADBURY, S.P., et al. Toxic responses of the fish nervous system. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. (Ed.). **The Toxicology of Fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor ; Francis Group, 2008. p.417-456.

BRADBURY, S.P.; COATS, J.R. Toxicokinetics and toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.8, p.373-380, 1989.

BRASIL. Decreto-Lei no 7802, de 11 de Julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. **Relatório de produtos formulados**. 2013. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 29/05/2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Portaria n. 357, de 17 de março 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Gf de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS n.º 518/2004**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2005b.

BREWER, S.K. et al. Behavioral disfunctions correlate to altered physiology in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p.70-76, 2001.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

ÇALISKAN, M.; ERKMEN, B.; YERLI, S.V. The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.14, p.117-120, 2003.

CARR, R.S. et al. Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. **Analytical Chemistry**, v.55, p.1229-1236, 1983.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as na in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v.47, p.2123 -2136, 1990.

CARVALHO, V.M. Adutos de DNA gerados por produtos da lipoperoxidação: caracterização, detecção, incorporação em oligonucleotídeos e implicações biológicas. p.236 Tese (Doutorado, Bioquímica) - Universidade de São Paulo, 2001.

ÇAVAS, T.; GARANKO, N.; ARKHIPCHUK, V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, n.4, p.569-574, 2005.

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

COATS, J.R. Toxicology of synthetic pyrethroid insecticides. In: DI GIULIO, R.T.; D.E. HINTON (Ed.). **The toxicology of fishes**, Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor; Francis Group, 2008. p. 805-818.

CORTELLA, L.R.X. Estresse oxidativo em matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829, Characidae), exposto ao inseticida piretroide Keshet®. p.101. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, 2010.

DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and hematological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.134, p.109-121, 2003.

DEMOUTE, J. A. Brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. **Pesticide Science**, v.27, p.375-385, 1989.

DESTRUTI, A.B.C.B. **Introdução à farmacologia**. Destruti, ABCB, Arone, EM, Philippi, MLS (Eds), Introdução a Farmacologia. São Paulo: Editora Senac São Paulo: Apontamentos Saúde, 1999.

DI GIULIO, R.T.; MEYER, J.N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. (Ed.). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008. p. 273-326.

DRABKIN, D.L. The standardization of hemoglobin measurement. **The American Journal of the Medical Sciences**, n. 215, v. 1, p. 110-111, 1948.

EDWARDS, R., MILLBURN, P.; HUTSON, D.H. Factors influencing the selective toxicity of cis- and trans-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail: biotransformation in liver, plasma, brain and intestine. **Pesticide Science**, v. 21, p.1-21, 1987.

ELLIOTT, M. Properties and applications of pirethroids. **Environmental Health Perspectives**, v.14, p.3-13, 1976.

ELLMAN, G.L. et al. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, n.7, p. 88-95, 1961.

ENSIBI, C., et al. D. Effects of deltamethrin on biometric parameters and liver biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.36, n. 2, p. 384-391, 2013.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMEA. **Committee for Veterinary Medicinal Products. Cypermethrin (Extension for Salmonidae)**, The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Veterinary Medicines and Inspections. 2003.

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

FERRARO, M. V. M, et al. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.1, p.103-107, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Pesticide residues in food : toxicological evaluations, sponsored jointly by FAO and WHO, with the support of the International Programme on Chemical Safety / Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and WHO Core Assessment Group**, Rome, Italy, 3–12, 2006.

FRENZILLI G.; NIGRO, M.; LYONS, B.P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v.681, p.80-92, 2009.

GENTZKOW, C.J.; MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **The Journal Biological Chemistry**, v.143, p. 531-544, 1942.

GOLDSTEIN, E.G.; CLYMO, R.S. **Methods for chemicals analysis of freshwater**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1969. 171 p. (IBP Handbook, n. 8).

GOMES, L. C.; URBINATI, E. C. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. 470p.

GONTIJO, A. M. M. C; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO L.R.; SALVADORI D.M.F.; MARQUES E.K., (Eds). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra, 2003. p. 247-79.

GOULDING, A.T. et al. Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.157, n.3, p.280-286, 2013.

GREENWELL, M.G.; SHERRILL, J.; CLAYTON, L.A. Osmoregulation in fish, mechanisms and clinical implications. **The Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v.6, p.169-189, 2003.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v.41/42, p.1819-1828, 1995.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicoty bioassays. **Environmental Science & Technology**, v.7, p.714-719, 1977.

HART J.L. et al. Novel cypermethrin formulation for the control of sea lice on salmon (*Salmo salar*). **Veterinary Record**, v.140, p.179-181. 1997.

HAYA, K. Toxicity of pyrethroid insecticide to fish. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v.8, p.381-391, 1989.

HAYA, K., et al. A review and assessment of environmental risk of chemicals used for the treatment of sea lice infestations of cultured salmon. In: HARGRAVE, B (Ed.). **The handbook of environmental chemistry, Environmental Effects of Marine Finfish Aquaculture**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, Berlin, 2005. p. 305-340.

HERNÁNDEZ-MORENO, D., et al. Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. **Science of Total Environment**, v.408, p.4976-4983, 2010.

HINTON, D.E., et al. Liver Toxicity. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E., (Ed.). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008. p. 327-400.

HOUSSAIN, M.M., et al. H. The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. **Neurotoxicology**, v.25, p. 825-833, 2004.

HOUSTON, A.H. Review: are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? **Transactions of the American Fisheries Society**, v.126, n.6, p. 879-894. 1997.

HUSSIEN, H.M.; ABDOU, H.M.; YOUSEF, M.I. Cypermethrin induced damage in genomic DNA and histopathological changes in brain and haematotoxicity in rats: the protective effect of sesame oil. **Brain Research Bulletin**, v.92, p.76-83, 2013.

INOUE, L.A.K.A.; NETO, C.S.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1896). **Ciência Rural**, v.33, n.5, p. 943-947, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**: Brasil. 2010. Disponível em: <[http://www.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/default\\_2010.shtm](http://www.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/default_2010.shtm)>. Acesso em: 29/09/2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**: Brasil, 2008. Disponível em [http://www.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/default\\_2008.shtm](http://www.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/default_2008.shtm). Acesso em 29/07/2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**: Brasil, 2008. Disponível em <[http://www.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids\\_2004.shtm](http://www.INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids_2004.shtm)>. Acesso em 27/09/2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Estatística da Pesca 2005, Brasil Grandes regiões e unidades da federação**. Brasília, 110 p. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Avaliação da toxicidade aguda para peixes**. In: Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, DF, Parte D. 3. 1987.

JAENSSON, A., et al. Effects of pyrethrin pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behavior in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). **Aquatic Toxicology**, v.81, p.1-9, 2007.

JEZEK, P.; HLAVATÁ, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.37, p.2478-2503, 2005.

JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p. 207-221, 2008.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JIN, Y., et al. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v.82, p.398-404, 2011.

JONES, D. **Environmental fate of cypermethrin**. Sacramento, CA: Environmental Monitoring and Pest Management Department of Pesticide Regulation, 1995.

KALE, M. et al. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rats erythrocytes: as possible involvement of reactive oxygen species. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 105, p.197-205. 1999.

KAN, Y.; et al. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to deltamethrin. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.34, p.170-179, 2012.

KELLY, S.A., et al. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. **Environmental Health Perspectives**, v.106, p.375-384, 1998.

KLEINOW, K.M., et al. Toxicokinetics in Fishes. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. (Ed.). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008. p. 55-152.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.5751-5754, 1982.

KORKMAZ, N. et al. Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, p.198-205, 2009.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantification. In: WALKER, J. M. (Ed.). **Methods in molecular biology: Basic protein and peptide protocols**. Totowa: Human Press Inc., 1994.

KUMAR, A. et al.  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Pesticide Biochemistry Physiology**, v.93, p.96-99, 2009.

KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, S. Assessment of acute toxicity of lambda-cyhalothrin to a freshwater catfish, *Clarias batrachus*. **Environmental Chemistry Letters**, v.9, p.43-46, 2011.

KUMAR, S.; LATA, S.; GOPAL, K. Deltamethrin induced physiological changes in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 254-258, 1999.

LESSER, M. P. Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: ABELE, D., VÁZQUEZ-MEDINA, J.P.; ZENTENO-SAVÍN, T. (Ed.). **Oxidative stress in aquatic ecosystems**. 1ed, Chichester, UK: Blackwell-Wiley Publishing LTd. 2012.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIN, H.; RANDALL, D.J. H<sup>+</sup>-ATPase activity in crude homogenates of fish gill tissue: inhibitor sensitive and environmental and hormonal regulation. **The Journal of Experimental Biology**, v.180, p.163-174, 1993.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, p.13-30, 2011.

MA, Y. et al. Enantioselectivity in aquatic toxicology of synthetic pyrethroid insecticide fenvalerate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1913-1918, 2009.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.1, p.63-76, 1999.

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

MARINO, D.; RONCO, A. Cypermethrin and Chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.75, p.820-826, 2005.

MATSUOKA, T. Determination of methemoglobin and carboxyhemoglobin in blood by rapid colorimetry. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.20, n.11, p.1208-1211, 1997.

MEYER, F.P. Aquaculture disease health management. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4201-4208. 1991.

MISHRA, D.; SRIVASTAV S.K.; SRIVASTAV, A.K. Effects of cypermethrin on plasma calcium and ultimobranchial gland of a teleost, *Heteropneustes fossilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.193-197, 2005.

MONTANHA, F.P. et al. Pyrethroid toxicity in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.12, p.1297-1303, 2012.

MUSHIGERI, S.B.; DAVID, M. Fenvalerate induces damages in the Ach and associated AChE activity in different tissues of fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) under lethal and sub-lethal exposure period. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.20, p.65-72, 2005.

NARAHASHI, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. **Pharmacology and Toxicology**, v.79, p.1-14, 1996.

NARAHASHI, T. Transmitter-activated ion channels as the target of chemical agents. **Advances in Experimental Medical and Biology**, New York, v.287, p.61-73, 1991.

OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p. 57-149, 2003.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, **Guideline for testing of chemicals, Fish, Acute Toxicity Test**, 9p. 1992.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Environmental Health Criteria 82, Cypermethrin**, 1989.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene and  $\beta$ -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. **Environmental International**, v.28, p.285-293, 2002.

PARANÁ, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná - SEAB. **Bulas de inseticidas**. Disponível em <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/GALGOTRIN.pdf>> Acesso em 29/05/2013> 2013.

PEAKALL, D. B. The use of biomarkers in hazard assessment. In: PEAKALL, D.B. et al. (Eds). **Biomarkers: a pragmatic basis for remediation of severe pollution in eastern Europe** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v.1, n.9, 1999. p.123-133.

PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fish. **Annual Review of Physiology**, v.59, p.325-347, 1997.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Biochemical effects of stress. In: HOCHACHKA; MOMMSEN (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of fishes**, vol.5. Amsterdam: Elsevier Science B. V. 1995. p. 349-379

PIMPÃO, C.T.; ZAMPRONIO, A.R.; ASSIS, H.C.S. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p.122-127, 2007.

PINER, P.; ÜNER, N. Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.33, p.414-420, 2012.

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, 1994. p.339-352.

- QUABIUS, E. S.; BALM, P. H. M.; WENDERLAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126: general and comparative. **Endocrinology**, v.108, p.472 – 482, 1997.
- RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology**: effects, environmental fate, and risk assessment. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995. p.3-66.
- RASMUSSEN, J.J.; FRIBERG, N.; LARSEN, S.E. Impact of lambda-cyhalothrin on a macroinvertebrate assemblage in outdoor experimental channels: Implications for ecosystem functioning. **Aquatic Toxicology**, v.90, p.228-234, 2008.
- REBEC, G.V.; PIERCE, R.C. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. **Progress in Neurobiology**, v.43, p.537-565, 1994.
- REDDY, P.M.; PHILIP, G.H. Changes in the levels of respiration and ions in the tissues of freshwater fish, *Labeo rohita* under fenvalerate stress. **Chemosphere**, v.25, n.6, p.843-852, 1992.
- REDDY, P.M.; PHILIP, G.H.; BASHAMOHIDEEN, M.D. Regulation of AChE system of freshwater fish, *Cyprinus carpio*, under fenvalerate toxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.48, p.18-22, 1992.
- REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v.50, p.351-361, 2000.
- SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.80, p.49-52, 2008.
- SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretroides: uma visão geral. **Alimentação e Nutrição, Araraquara**, v.18, p.339-349, 2007.
- SARAVANAN, R.; REVATHI, K.; MURTHY, P.B. Lambda cyhalothrin alterations in *Clarias batrachus*. **Journal of Environmental Biology**, v.30, n2, p.265-270, 2009.

SARKAR, B. et al. Carbofuran- and cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery. **Journal Applied Ichthyology**, v. 21, p. 131-135. 2005.

SAXENA, K.K.; SETH, N. Toxic effects of cypermethrin on certain hematological aspects of fresh water fish *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, p. 364-369, 2002.

SAXENA, P.N.; CHAUHAN, L.K.S.; GUPTA, S.K. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: Spectroscopic basis of chromosome damage. **Toxicology**, v. 216, p. 244-252, 2005.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.56, 2003. p.295-301.  
SCHLENK, D. et al. Biomarkers. In: DI GIULIO, RT.; HINTON D.E. (Eds). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis. 2008. p. 684-713.

SCHWAIGER, J. et al. The use of histopatological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v.6, p.75 – 86, 1997.

SCOTT, G.R.; SLOMAN, K.A. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. **Aquatic Toxicology**, n. 68, p. 369-392, 2004.

SCOTTISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – SEPA. **Policy on the use of cypermethrin in marine fish farming risk assessment, EQS and recommendations**. Disponível em < <http://sepa.org.uk/aquaculture/policies/index.htm> Policy No. 30.>. 1998.

SEPICI-DINÇEL, A. et al. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1433-1439, 2009.

SIES, H. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SILVA, A.G. Alterações histológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, 2004.

SIMONIELLO, M.F. et al. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, p.155-158, 2009.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SODERLUND, D.M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3-59, 2002.

SOGORB, M.A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, v. 128, p. 215-228, 2002.

SOMNUEK, C. et al. Gene expression of acetylcholinesterase in hybrid catfish (*Clarias gariepinus* x *Clarias macrocephalus*) exposed to chlorpyrifos and carbaryl. **Journal of Environmental Biology**, v.30, n.1, p.83-88, 2009.

SUBASINGHE, R.; SOTO, D.; JIA, J. Global aquaculture and its role in sustainable development. **Reviews in Aquaculture**, v.1, p.2-9, 2009.

SUNNY, F.; OOMMEN, O.V. Rapid action of glucocorticoids on branchial ATPase activity in *Oreochromis mossambicus*: an *in vivo* and *in vitro* study. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v.130, p.323-330, 2001.

SUVETHA, L.; RAMESH, M.; SARAVANA, M. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.29, p44-49, 2010.

SVOBODOVA, S.; LUSKOVA, J.; LABEK, V. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Veterinaria Brno**, v.72, p.79-85, 2003.

SZEGLETES, T. et al. In vivo effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.31, p.258-263, 1995.

TICE, R.R. et al.. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-21, 2000.

UEDA, T., et al. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange test using fish erythropoietic and embryonic cells. *Water Science and Technology*, v.25, p.235-240, 1992.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. **Reregistration Eligibility Decision for Cypermethrin (revised 01/14/08)**, List B, Case no. 2130, 2008.

VANI, T. et al. Alteration in haematological and biochemical parameters of *Catla catla* exposed to sub-lethal concentration of cypermethrin. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.38, n.6., p.1577-84, 2012.

VELMURUGAN, B. et al. 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.

VERMA, S.R. et al. Evaluation of acute toxicity of phenol and its chloro- and nitro-derivates to certain teleosts. **Water Air Soil Pollution**, v.14, p.95-102, 1980.

VIEIRA, H.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretroides e análise por CG. **Química Nova**, v.30, n.3, p.535-540, 2007.

VIJAYAVEL, K.; BALASUBRAMANIAN, M.P. Interaction of potash and decis in the ecophysiology of a freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, n.2, p.154-158, 2007.

VIRAN, R., et al. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.55, p.82-85, 2003.

WANG, W. et al. Comparison of the acute toxicity for gamma-cyhalothrin and lambda-cyhalothrin to zebra fish and shrimp. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.47, p.184-188, 2007.

WERNER, I.; MORAN, K. Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organisms synthetic pyrethroids: occurrence and behavior in aquatic environments. **American Chemical Society: Washington, DC**, p. 310-334, 2008.

WHEELOCK, C.E. et al. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p.172-192, 2005.

WILSON, B.W. Cholinesterases. In: KRIEGER, R.I (Ed) **Handbook of Pesticide Toxicology** vol.2. San Diego CA: Academic Press, 2001. p. 967-985.

YAMAMOTO, K.; ITAZAWA, Y.; KOBAYASHI, H. Direct observation of fish spleen by an abdominal window method and its application to exercised and hypoxic yellowtail. **Japanese Journal of Ichthyology**, v.31, n.4, p.427-433, 1985.

YILMAZ, M.; GÜL, A.; ERBASLI, K. Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1859). **Chemosphere**, v.56, p.381-385, 2004.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. p. 39-53.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEING, M.A. Potencialidad del género Brycon em la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.19, n.2, p. 233-240, 2006.

ZUCKER, E. **Hazard evaluation division: standard evaluation procedure – acute toxicity test for freshwater fish**, 1985. 17 p. USEPA publication 540/9-85-006.