

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À LAMBDA-CIALOTRINA NO TELEÓSTEO *Brycon  
amazonicus*: METABOLISMO ANTIOXIDANTE, PARÂMETROS HISTOLÓGICOS  
E HEMATOLÓGICOS**

**São Carlos – SP**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À LAMBDA-CIALOTRINA NO TELEÓSTEO *Brycon  
amazonicus*: METABOLISMO ANTIOXIDANTE, PARÂMETROS HISTOLÓGICOS  
E HEMATOLÓGICOS**

FRANCINE PERRI VENTURINI

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**

**2014**

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

V469ee

Venturini, Francine Perri.

Efeitos da exposição à lambda-cialotrina no teleósteo  
*Brycon amazonicus* : metabolismo antioxidante, parâmetros  
histológicos e hematológicos / Francine Perri Venturini. --  
São Carlos : UFSCar, 2015.  
125 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2014.

1. Bioquímica. 2. Estresse oxidativo. 3. Marcadores  
biológicos. 4. Inseticida piretróide. 5. Fauna neotropical. I.  
Título.

CDD: 574.192 (20<sup>a</sup>)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutora em Ciências da  
candidata Francine Perri Venturini, realizada em 05/11/2014:

---

Prof. Dr. Gilberto Moraes  
UFSCar

---

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes  
UFSCar

---

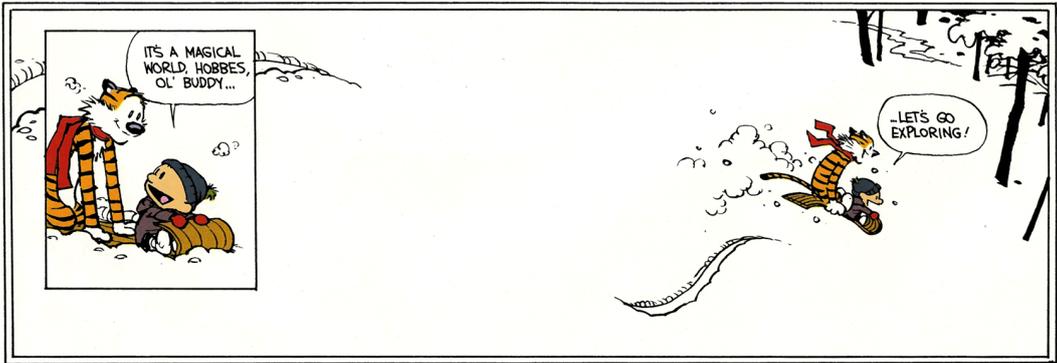
Profa. Dra. Lisandra Marques Gava Borges  
UFSCar

---

Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez  
UEL

---

Prof. Dr. Matheus Nicolino Peixoto Henares  
UNIFEB



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vera e Antonio, e à minha irmã Fabiola. O amor de vocês é a força que impulsiona meus objetivos.

Ao Prof. Gilberto, pelos ensinamentos compartilhados neste tempo de convivência. Os diálogos no laboratório fazem o trabalho muito mais leve!

Aos amigos do laboratório de Bioquímica Adaptativa: Araceli Hackbarth, Camila Pigão, Cleujosí Nunes, Fernanda Moraes, Fernando Fabrizzi, Gustavo Rojas, Ive Avilez, Lygia Pereira, Luciana Almeida, Natália Shiogiri, Marcelo Paulino, Priscila Rossi e Thaianne Robeldo.

Às queridas amigas Fernanda Moraes e Priscila Rossi, por me ajudarem no decorrer de mais essa etapa.

Ao Sr. Toninho e Piau, pelo cuidado diário com os peixes.

Aos amigos do *Keneddy Lab*: Heather Osachoff, Jeremy Jackson, Lindsay DuGas e Sydney Love. A convivência com vocês tornou minha experiência canadense muito especial.

Ao Prof. Dr. Chris Kennedy, por ter aberto as portas de seu laboratório para meu estágio.

À banca avaliadora, pelas valiosas contribuições.

À Piscicultura Polletini e ao Sr. César Polletini, por fornecerem matrinxãs ao nosso laboratório.

Às secretárias do PPGGEV, pela gentileza e eficiência.

Ao Rubens, por tornar meus dias mais felizes.

À FAPESP, pelo financiamento ao projeto BEPE 2012/05900-7.

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo n. 2010/17007-0.

**Obrigado!**

---

## RESUMO

---

Atualmente, no Brasil o uso de agroquímicos é cada vez maior, sendo que há uma tendência à utilização de produtos considerados menos tóxicos. Por não se acumularem na cadeia trófica e apresentarem baixa toxicidade para aves e mamíferos, os piretroides sintéticos são uma alternativa ao uso de inseticidas persistentes no meio ambiente. A  $\lambda$ -cialotrina (LCH) é um inseticida piretroide utilizado no controle de amplo espectro de artrópodes. Tendo em vista a contaminação por LCH de ambientes aquáticos quer pelo uso doméstico, agrícola ou mesmo de forma irregular por piscicultores, faz-se necessário o estudo deste piretroide tanto quanto à sua toxicidade como quanto aos efeitos sobre os parâmetros bioquímico-metabólicos de espécies aquáticas, entre elas o matrinxã (*Brycon amazonicus*). O matrinxã é uma espécie neotropical originária da Bacia Amazônica, e das mais representativas na aquicultura brasileira. Com esse propósito, doze exemplares de *B. amazonicus* (n=12) foram expostos a uma concentração sub-letal ( $0,65 \mu\text{gL}^{-1}$ , 10% da CL<sub>50</sub>;96h) de LCH (TrincaCaps<sup>®</sup> DVA), por 96 horas e recuperados por 7 dias em água livre desse xenobiotico. Foram avaliados os efeitos hematológicos, osmorregulatórios, antioxidantes, neurotóxicos, histológicos e genotóxicos da LCH após os períodos experimentais. A LCH mostrou-se extremamente tóxica para *B. amazonicus*, visto a CL<sub>50</sub>;96h menor que  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ . Após a exposição, os peixes exibiram resposta indicativa de hipovolemia e danos aos processos respiratórios. Após a recuperação, os parâmetros estudados não se restabeleceram completamente, mas exibiram tendência à recuperação. O equilíbrio osmótico foi afetado após a exposição, não sendo totalmente recomposto após a recuperação. A atividade de acetilcolinesterase cerebral não se mostrou diferente em nenhum dos tempos avaliados. Observou-se modificações nas defesas antioxidantes hepática, renal e branquial, as quais não foram suficientes para evitar a peroxidação lipídica. Após a recuperação, algumas defesas permaneceram ativadas, porém não foi observada peroxidação lipídica em nenhum dos tecidos. A avaliação histológica mostrou danos hepáticos e renais, entretanto, não houve danos branquiais. O tecido renal foi severamente afetado, sendo a morfologia renal restabelecida após a recuperação, contrariamente ao observado no tecido hepático. A formação de micronúcleos e as alterações nucleares eritrocitárias não foram significativamente diferentes em nenhum dos tempos avaliados. As respostas obtidas nesse estudo mostram o potencial hepatotóxico e nefrotóxico da LCH ao *B. amazonicus*, ressaltando a importância de estudos que fundamentem a criação de legislações adequadas ao uso deste inseticida em

agricultura e piscicultura, posto que as modificações observadas podem promover prejuízos às populações naturais dessa espécie.

**Palavras-chave:** Bioquímica. Estresse oxidativo. Inseticida piretroide. Peixe Neotropical.

---

## ABSTRACT

---

Currently, in Brazil, there has been noticed increases of agrochemicals use, in spite the trend of using less toxic products. Pyrethroids appear as the option due to low toxicity displayed to birds and mammals, and the low bioaccumulation along the trophic chain. The pyrethroid insecticide  $\lambda$ -cyhalothrin (LCH) is used against a variety of arthropods. These chemicals can reach aquatic environments either by direct application in fish farms to kill parasites or by runoff after agricultural and domestic use, then affecting non-target organisms. We dealt with evaluation of antioxidant responses of matrixã, *Brycon amazonicus*, exposed to LCH (TrincaCaps<sup>®</sup> DVA) and its recovery, since this is a freshwater fish relevantly farmed in Brazil. Twelve fish (n=12) were exposed to 0.65  $\mu\text{gL}^{-1}$  (10% of the LC50;96h) for 96 hours and allowed to recover in a xenobiotic free water for 7 days. Hematological, osmoregulatory, antioxidant, neurotoxic, histologic and genotoxic effects were evaluated after sub-lethal exposure and recovery. LCH was extremely toxic to *B. amazonicus* since the LC50;96h was below 0.1  $\text{mgL}^{-1}$ . After the exposure span, fish exhibited impairment of respiratory functions and hypovolemia; the hematological parameters were not completely reestablished, despite a tendency to recover. The osmotic balance was affected after exposure, and it was not completely restored after recovery. The activity of brain acetylcholinesterase did not depict any change after both evaluation periods. Antioxidant defenses were activated in liver, kidney and gills, but this fact was not enough to prevent lipid peroxidation. After recovery, some defenses remained activated; nevertheless no lipid peroxidation was observed in any tissue. Histological parameters indicated liver and kidney injury, but no one was observed in gills. The kidney morphology was severely affected, but was reestablished after recovery; an opposite response was observed in liver. Micronuclei and nuclear alterations in erythrocytes were not observed after either exposure or recovery. We call attention to the hepatotoxic and nephrotoxic potential of LCH in *B. amazonicus*, emphasizing the importance of substantial studies to ground its use regulations in agriculture and aquaculture activities, since the set of injuries observed poses risk to this fish species.

**Keywords:** Biochemistry. Oxidative stress. Pyrethroid insecticide. Neotropical fish.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

- OH – radical hidroxila
- AChE – acetilcolinesterase
- ANE – alterações nucleares eritrocitárias
- Ca<sup>2+</sup>-ATPase – cálcio ATPase
- CAT – catalase
- CC – células cloreto
- CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média
- CL50 – concentração letal para 50% da população
- CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> - carbonato
- DNA – ácido desoxiribonucleico
- e<sup>-</sup> - elétron
- ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
- G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase
- GPx – glutaciona peroxidase
- GR – glutaciona redutase
- GSH – glutaciona
- GSSG – glutaciona 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><sup>•</sup> - ácido peroxil
- HOCl – ácido hipocloro
- Ht – hematócrito
- IHS – índice hepatossomático
- L• - radical alquila
- LCH – lambda-cialotrina
- LOO• - radical peroxila
- LOOH – hidroperóxidos de lipídios

LPO – Lipid Peroxidation – peroxidação lipídica

MHb - metahemoglobina

MN – micronúcleos

NKA – sódio potássio ATPase

$O_2^{\bullet -}$  - ânion superóxido

RBC – Red Blood Cell Count

$RO^{\bullet}$  - alcoxil

$RO_2^{\bullet}$  - peroxil

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

VCM – volume corpuscular médio

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Estrutura química das piretrinas. Fonte: Davies et al., 2007.....	6
Figura 2. Estrutura química da permetrina (piretroide tipo I) e da ciflutrina (piretroide tipo II). Fonte: Anadón et al., 2009. ....	8
Figura 3. Persistência de dos piretroides lambda-cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água por 80 dias. Fonte: Vieira et al., 2007. ....	9
Figura 4. Quantidade de produtos comerciais registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, cujos ingredientes ativos são piretroides. Fonte: Brasil, 2014. ....	11
Figura 5. Estrutura da lambda-cialotrina. Fonte: Anadón et al., 2009.....	13
Figura 6. Efeito de piretroides na excitabilidade neuronal. Fonte: adaptado e traduzido de Shafer et al. (2005). ....	15
Figura 7. Modelo da absorção de íons em peixes de água doce. Fonte: adaptado e traduzido de Marshall (2002).....	25
Figura 8. Reações de redução do O <sub>2</sub> . Fonte: a autora. ...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 9. Reação de Haber-Weiss. Fonte: a autora. ....	29
Figura 10. Reação catalisada pela enzima superóxido dismutase. Fonte: a autora. ...	30
Figura 11. Reação catalisada pela enzima catalase. Fonte: a autora.....	31
Figura 12. Reações catalisada pela enzima glutathione peroxidase. Fonte: a autora. ..	32
Figura 13. Ciclo redox, representando a formação de radicais, as defesas antioxidantes e seus efeitos. Fonte: adaptado e traduzido de Kelly et al., 1998.....	34
Figura 14. Equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO e os potenciais efeitos biológicos. Fonte: traduzido e adaptado de Lushchak (2011).....	35
Figura 15. Mecanismo de formação de micronúcleo em células mononucleadas. Fonte: adaptado e traduzido de Al-Sabti e Metcalfe, 1995. ....	40
Figura 16. Exemplar de matrinxã ( <i>Brycon amazonicus</i> ). Fonte: Moraes (2013). ....	42
Figura 17. CL50;96hs de LCH para <i>Brycon amazonicus</i> .....	62
Figura 18. Índice hepatossomático de matrinxãs expostos à LCH e recuperados.....	63
Figura 19. Atividade específica de NKA branquial de matrinxãs expostos à LCH e de matrinxãs recuperados.....	65

Figura 20. Atividade específica da AChE cerebral de peixes expostos à LCH e de peixes recuperados.....	65
Figura 21. Concentração de ácido ascórbico em cérebro de matrinxã após exposição a LCH e recuperação.....	66
Figura 22. Concentração de ácido ascórbico em fígado de matrinxã após exposição a LCH e recuperação.....	67
Figura 23. Concentração de glutathiona reduzida em fígado de matrinxã após exposição a LCH e recuperação.....	67
Figura 24. Formação de TBARS em fígado de matrinxã após exposição à LCH e recuperação.....	68
Figura 25. Formação de TBARS em rim de matrinxã após exposição à LCH e recuperação.....	69
Figura 26. Formação de TBARS em brânquias de matrinxã após exposição à LCH e recuperação.....	70
Figura 27. Fotomicrografia de fígado de <i>B. amazonicus</i> expostos à LCH..	71
Figura 28. Fotomicrografia de rim de <i>B. amazonicus</i> expostos à LCH..	74
Figura 29. Fotomicrografia de brânquia de matrinxã <i>B. amazonicus</i> expostos à LCH.	76
Figura 30. Fotomicrografia de eritrócitos de matrinxã <i>B. amazonicus</i> expostos à LCH. .....	78

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. Qualidade da água no experimento de exposição sub-letal (20 % da CL50;96h) de LCH, por 96 horas. Média e desvio padrão para o total de coletas de água (n=4).....	47
Tabela 2. Alterações histopatológicas em fígado, rim e brânquias e respectivos estágios, baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões. 59	
Tabela 3. Classificação da severidade das alterações do órgão conforme o Índice de Alterações Histopatológicas (IAH). .....	60
Tabela 4. Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos de peixes expostos à LCH e de peixes recuperados.....	64
Tabela 5. Íons plasmáticos de peixes exposto à LCH e de peixes recuperados. ....	64
Tabela 6. Atividade das enzimas antioxidantes e de G6PDH em fígado de peixes expostos à LCH e de peixes recuperados.....	68
Tabela 7. Atividade das enzimas antioxidantes e da G6PDH em rim de peixes expostos à LCH e de peixes recuperados.....	69
Tabela 8. Atividade das enzimas antioxidantes e da G6PDH em brânquia de peixes expostos a LCH e de peixes recuperados.....	70
Tabela 9. Frequência de alterações em fígado de <i>B. amazonicus</i> expostos à LCH e recuperados.....	73
Tabela 10. Frequência de alterações em rim de <i>B. amazonicus</i> expostos à LCH e recuperados.....	75
Tabela 11. Frequência de alterações em brânquias de <i>B. amazonicus</i> expostos à LCH e recuperados.....	77
Tabela 12. Formação de micronúcleo e alterações nucleares eritrocíticas por mil células (média % ± erro padrão) em sangue de <i>B. amazonicus</i> expostos à LCH e recuperados.....	78
Tabela 12. Valores da CL50;96h de espécies de peixes expostas a LCH.....	79

---

## SUMÁRIO

---

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
SUMÁRIO.....	XIV
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
2.1. INSETICIDAS PIRETROIDES.....	5
2.2. A UTILIZAÇÃO DE PIRETROIDES NO BRASIL.....	9
2.3. LAMBDA-CIALOTRINA.....	12
2.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS PIRETROIDES.....	14
2.5. PIRETROIDES NO AMBIENTE AQUÁTICO.....	18
2.6. BIOMARCADORES E EFEITOS DE PIRETROIDES EM PEIXES.....	21
2.7. MATRINXÃ (BRYCON AMAZONICUS).....	41
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1. DESENHO EXPERIMENTAL.....	45
4.2. DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA CL50;96H DA LCH PARA O MATRINXÃ.....	45
4.3. EXPOSIÇÃO SUB-LETAL À LCH E RECUPERAÇÃO.....	46
4.4. PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA.....	48
4.5. ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS).....	48
4.6. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	48
4.6.1. Hematócrito.....	48
4.6.2. Hemoglobina total.....	48
4.6.3. Contagem de eritrócitos (RBC).....	48
4.6.4. Volume corpuscular médio (VCM).....	49
4.6.5. Hemoglobina corpuscular média (HCM).....	49
4.6.6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).....	49
4.7. METAHEMOGLOBINA (MHB).....	49
4.8. ÍONS PLASMÁTICOS (NA <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> E CL <sup>-</sup> ).....	50
4.9. PROTEÍNA PLASMÁTICA.....	50
4.10. ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS.....	51
4.11. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	52
4.11.1. Acetilcolinesterase (AChE).....	52

4.11.2.	<i>Atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase branquial (NKA)</i> .....	53
4.11.3.	<i>Proteína nos homogeneizados de tecidos</i> .....	56
4.12.	SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	56
4.13.	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	57
4.14.	TESTE DO MICRONÚCLEO (MN) E ALTERAÇÕES NUCLEARES ERITROCITÁRIAS (ANE) 60	
4.15.	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	60
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
5.1.	ESTIMATIVA DA CL50;96H E SINAIS DE INTOXICAÇÃO.....	62
5.2.	EXPOSIÇÃO SUB-LETAL E RECUPERAÇÃO .....	63
5.2.1.	<i>Índice hepatossomático</i> .....	63
5.2.2.	<i>Parâmetros hematológicos e balanço iônico</i> .....	63
5.2.3.	<i>Atividade da AChE cerebral</i> .....	65
5.2.4.	<i>Sistema antioxidante</i> .....	66
5.2.5.	<i>Análises histopatológicas</i> .....	71
5.2.6.	<i>Teste do micronúcleo (MN) e alterações nucleares eritrocitárias (ANE)</i> ..	77
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>79</b>
6.1.	ESTIMATIVA DA CL50;96H E SINAIS DE INTOXICAÇÃO.....	79
6.2.	EXPOSIÇÃO SUB-LETAL.....	81
6.2.1.	<i>Índice hepatossomático (IHS)</i> .....	81
6.2.2.	<i>Parâmetros hematológicos e balanço iônico</i> .....	82
6.2.3.	<i>Neurotoxicidade</i> .....	89
6.2.4.	<i>Sistema antioxidante</i> .....	91
6.2.5.	<i>Análises histopatológicas</i> .....	100
6.2.6.	<i>Teste do micronúcleo (MN) e alterações nucleares eritrocitárias (ANE)</i>	106
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>108</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

As atividades de cultivo de alimentos podem, indiretamente, expor organismos aquáticos a uma variedade de compostos tóxicos. No que concerne à agricultura, agroquímicos são utilizados com o objetivo de erradicar pragas; no entanto, estes produtos podem ser lixiviados e atingir os corpos d'água, causando efeitos adversos em peixes e invertebrados aquáticos. Nas atividades de aquicultura, estes xenobióticos são úteis no combate a parasitos de peixes e insetos que infestam os tanques de cultivo, expondo os organismos não alvo, como os peixes, aos pulsos periódicos de contaminação.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2008), e mais de 110 mil toneladas de inseticidas foram vendidas entre 2010 e 2011 (ANVISA, 2012). A ANVISA banuiu vários ingredientes ativos de agrotóxicos no país, dentre os quais os organofosforados monocrotofós, triclorfom e metamidofós, e os organoclorados lindano e pentaclorofenol (ANVISA, 2013), o que pode resultar em aumento no consumo de outros grupos de inseticidas, como os piretroides.

Os piretroides, inseticidas sintéticos derivados das piretrinas, foram desenvolvidos no início da década de 1970 e, dada sua alta efetividade, estabeleceram um novo padrão para os inseticidas de contato (CASIDA; QUISTAD, 1998). A utilização de piretroides está em ascensão em todo o mundo, por serem considerados potentes, de rápida ação e apresentarem toxicidade seletiva; sendo eficazes no controle de insetos e relativamente inofensivos para mamíferos e aves (ELLIOT, 1976; SODERLUND et al., 2002; GOULDING et al., 2013; HAVERIN; VORNANEN, 2014).

O grupo dos piretroides é dividido em grupo I, os quais não apresentam o grupo substituinte  $\alpha$ -ciano, como a bifentrina, permetrina e resmetrina, e os do grupo II, que apresentam o grupo  $\alpha$ -ciano em sua estrutura, como a deltametrina, cipermetrina,

lambda-cialotrina e ciflutrina. Os piretroides do tipo II são, em geral, mais potentes do que aqueles do tipo I. A lambda-cialotrina (mistura de 1:1 de (Z)-(1R,3R)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzila e (Z)-(1S,3RS)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (R)-alfa-ciano-3-fenoxibenzila) (LCH) é um inseticida piretroide do tipo II, de amplo espectro, utilizado para o controle de uma grande variedade de artrópodes em plantações, corpos d'água e também em residências. No Brasil, há 105 compostos piretroides registrados para formulações comerciais, sendo a LCH o piretroide de tipo II com maior número de registros (BRASIL, 2014). Além disso, esse ingrediente ativo foi o piretroide mais utilizado de maneira irregular no Brasil no ano de 2011 (ANVISA, 2013).

O principal modo de ação dos piretroides é a alteração da permeabilidade dos canais de sódio voltagem-dependentes das células nervosas. Os piretroides modificam a cinética de ativação e inativação dos canais de sódio, resultando em aberturas prolongadas dos canais individuais. Isso provoca a despolarização da membrana, descargas repetitivas e perturbações sinápticas que levam aos sintomas de intoxicação por hiperexcitabilidade (VIJVERBERG; VAN DEN BERCKEN, 1990; NARAHASHI, 1996; SODERLUND et al., 2002).

Os piretroides são utilizados na produção agrícola, no controle de insetos vetores e de ectoparasitos animais, incluindo peixes (HART et al, 1997; EMEA, 2003; ANVISA, 2007; US EPA, 2008). Embora este grupo de inseticidas seja efetivo no controle de parasitos de peixes, como o piolho-do-mar, as implicações da exposição de organismos não-alvo, como espécies migratórias e mesmo as comerciais, ainda são pouco claras (GOULDING et al., 2013).

Segundo relatos da literatura, os peixes são bastante sensíveis à intoxicação por piretroides. Os efeitos oriundos desta exposição são amplamente estudados, sendo descritas alterações hematológicas (PARMA et al., 2007; EL-SAYED et al., 2007; PIMPÃO et al., 2007; SEPICI-DINÇEL et al., 2009); histopatológicas (CENGİZ,

2006; VELMURUGAN et al., 2007; KORKMAZ et al., 2009; KAN et al., 2012); enzimáticas e metabólicas (VELISEK et al., 2007; GUARDIOLA et al., 2013; FORSGREN et al., 2013); neurotoxicidade (SZEGLITES et al., 1995; KUMAR et al., 2008) e genotoxicidade (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; VELMURUGAN et al., 2006; ANSARI et al., 2008; MURANLI; GÜNER, 2011). Estes efeitos podem levar a implicações ecológicas para as populações de peixes, tais como comprometimento na procura por alimento e abrigo, modificações em comportamento de corte, vulnerabilidade a predadores, entre outras, colocando em risco a sobrevivência de muitas espécies. Outrossim, por serem fontes de alimento e subsistência, os efeitos dos piretroides em peixes podem afetar diretamente as comunidades que dependem da pesca, bem como causar efeitos adversos oriundos do consumo de animais contaminados.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2014), em 2012, o Brasil foi o segundo maior produtor de pescado do continente americano, contribuindo com 22,2% da produção. O matrinxã (*Brycon amazonicus*) é um peixe Neotropical originário da bacia amazônica e amplamente criado no Brasil. O valor econômico do matrinxã está relacionado à rápida e crescente criação desta espécie na Amazônia, sendo superada apenas pela demanda de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Segundo Zaniboni-Filho e colaboradores (2006), o matrinxã tem ótima aceitabilidade no mercado devido ao agradável sabor da carne, crescimento inicial rápido e fácil manuseio. Esses dados evidenciam a importância e o crescimento da aquicultura brasileira e, somados ao fato de que o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2008), mostram a relevância de estudos que associem pesticidas amplamente utilizados e espécies aquáticas cultivadas, no que tange aos efeitos provocados pela exposição de organismos não alvo aos xenobióticos.

A partir do exposto, a avaliação das interações entre a lambda-cialotrina, que é o piretroide de tipo II com maior número de registros no Brasil, e o matrinxã, uma das

espécies mais cultivadas na aquicultura brasileira, podemos inferir a importância de se conhecer os efeitos adversos advindos dessa interação. O estudo desses efeitos visa também aumentar o número de critérios para a utilização destes xenobióticos, garantindo assim a utilização adequada de agroquímicos e o consumo seguro de fontes de alimento.

---

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1. Inseticidas piretroides

A crescente demanda por alimentos, aliada ao crescimento exponencial da população, levam à agricultura focada em ganhos de produtividade. Muitas vezes, pragas como plantas invasoras, fungos, bactérias e insetos significam grandes perdas nas plantações e, conseqüentemente, grandes perdas econômicas. Assim, os agroquímicos atuam no combate aos fatores que causam prejuízos na agricultura, em uma tentativa de minimizar os danos causados por pragas. No entanto, o uso indiscriminado de produtos químicos pode acarretar prejuízos ambientais ainda maiores, principalmente quando aliado à falta de fiscalização e de legislações adequadas, situações que vigoram na maior parte do Brasil.

O uso de produtos para o combate de pragas agrícolas (em grande escala) iniciou-se com a utilização de produtos inorgânicos, como arsênico, enxofre, ácido bórico e outros. Em seguida, surgiram os produtos botânicos, os quais apresentavam disponibilidade limitada e eram altamente fotolábeis. A partir da década de 1920, esforços foram feitos para a síntese de compostos mais potentes e estáveis, o que culminou na utilização de organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides para fins inseticidas (CASIDA; QUISTAD, 1998).

O Decreto n. 4.074 de Janeiro de 2002, que regulamenta a Lei 7.802/1989, em seu artigo 1º, define que:

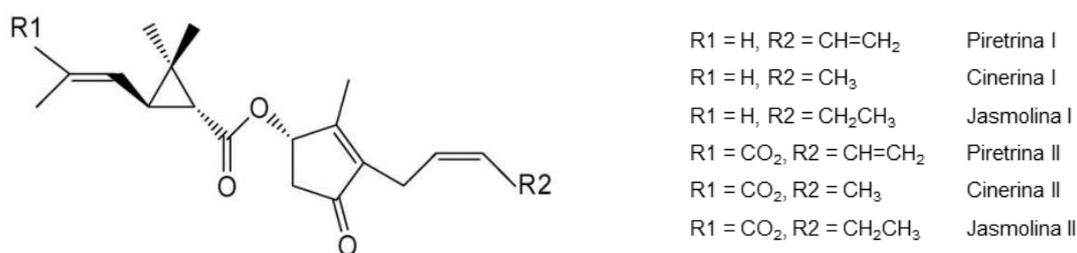
Agrotóxicos e afins são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Essa ampla definição compreende os acaricidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas e raticidas. Os compostos piretroides são inseticidas sintéticos derivados

estruturalmente das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores de *Chrysanthemum* sp.

As piretrinas I são ésteres do ácido crisantêmico, ao passo que piretrinas II são ésteres do ácido pirétrico. A ligação álcool das piretrinas apresenta três variações naturais, originando a seguinte série de piretrinas: piretrina I e II, cinerina I e II e jasmolina I e II (Figura 1). As piretrinas foram bastante utilizadas como inseticidas, no entanto, esses compostos apresentam grande instabilidade à luz e ao ar, o que levou à necessidade de desenvolvimento de compostos sintéticos mais estáveis (SODERLUND et al., 2002; DAVIES et al., 2007; SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

**Figura 1.** Estrutura química das piretrinas.



Fonte: Davies et al., 2007.

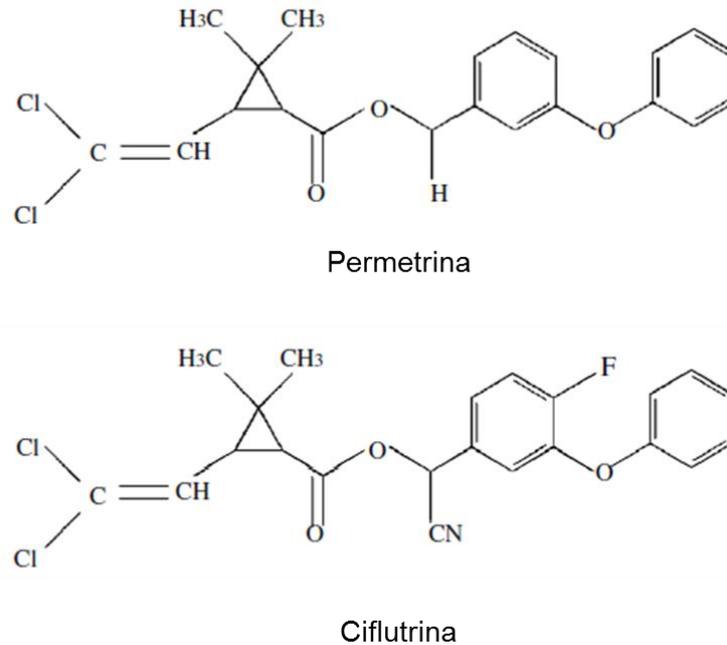
As modificações estruturais das piretrinas, no período de 1924 a 1970, produziram os primeiros piretroides sintéticos. Os compostos iniciais, como resmetrina, tetrametrina e aletrina foram sintetizados como misturas isômeras 1RS, cis, trans, ao passo que os isômeros 1R, trans, apresentam o prefixo “bio” e são denominados bioresmetrina e bioaletrina. Os compostos mais potentes, na época, apresentavam grupos carbonil nas ligações ácido ou álcool. No entanto, a efetividade e estabilidade dos piretroides foram aumentadas com substituições nas ligações álcool e ácido, o que conferiu maior fotoestabilidade sem a perda da ação inseticida; este foi o caso da permetrina, que foi o primeiro piretroide estável o suficiente para uso agrícola. Já a inclusão de um substituinte  $\alpha$ -ciano na ligação álcool, como ocorre com a cipermetrina,

ciflutrina, cialotrina, deltametrina, entre outros, produziu compostos com potência substancialmente maiores e a mesma fotoestabilidade (CASIDA et al., 1983; SODERLUND et al., 2002). Estes últimos compostos são mais fotoestáveis, apresentam alta atividade inseticida, baixa toxicidade para mamíferos e persistência limitada no solo. A diversidade estrutural dos piretroides foi aumentada ainda mais pela substituição da ligação ácida 2,2 – dimetilciclopropanocarboxílica pela ligação ácida  $\alpha$ -isopropilfenilacético, produzindo assim o fenvalerato. Ainda são estudadas modificações estruturais para novos compostos, mas ainda sem representantes para uso em escala comercial (SODERLUND et al., 2002). Em 2007, os piretroides compreendiam cerca de 17% do mercado mundial de inseticidas (DAVIES et al., 2007).

A toxicidade, bem como a atividade inseticida dos piretroides, é dependente da estereoquímica do composto: geralmente os isômeros *cis* são mais tóxicos que os isômeros *trans*; e a introdução do grupo  $\alpha$ -ciano aumenta a toxicidade da molécula tanto para insetos como para mamíferos (CASIDA et al., 1983). Verschoyle e Aldridge (1980) e, posteriormente, Lawrence e Casida (1982) dividiram os piretroides em duas classes, de acordo com o tipo de síndrome que a intoxicação causa em mamíferos: classe T (tremor) e classe CS (coreoatetose). A classe T compreende os compostos cuja intoxicação causa hipersensibilidade e agressividade, seguida por acessos de tremores, espasmos convulsivos, coma e morte. Já os compostos cuja intoxicação causa salivação, movimentos involuntários das pernas e convulsões contorcidas progressivas, foram incluídos na classe denominada CS. Gammon e colaboradores (1981) consideraram a estrutura química, os sinais de intoxicação em insetos e a ação *in vitro* em células nervosas de insetos para a classificação. Dessa forma, os piretroides que causam síndrome T e não apresentam um grupo ciano em sua estrutura são classificados em tipo I; enquanto que os compostos que causam a síndrome CS e apresentam um grupo ciano em sua estrutura, são classificados em tipo II. Dentre os piretroides mais utilizados atualmente e anteriormente citados, a

cismetrina e a permetrina são compostos do tipo I, ao passo que a deltametrina, ciflutrina, cipermetrina e cialotrina são piretroides do tipo II. A Figura 2 mostra a estrutura da permetrina e da ciflutrina.

**Figura 1.** Estrutura química da permetrina (piretroide tipo I) e da ciflutrina (piretroide tipo II).

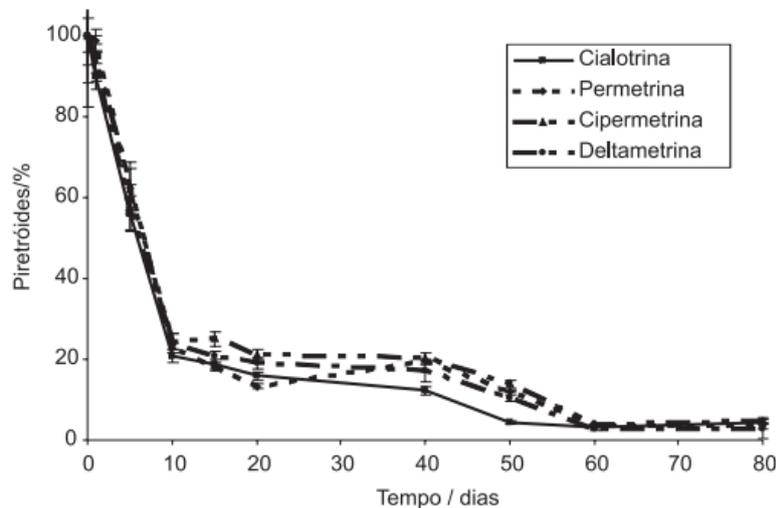


Fonte: Anadón et al., 2009.

A determinação e a quantificação de resíduos de agrotóxicos no ambiente são relevantes para estudos ambientais, visto que compostos eficientes e pouco persistentes são desejáveis para minimizar os prejuízos causados por esses xenobióticos nos ecossistemas. Em ambiente estuarino, os piretroides fenvalerato e permetrina exibiram meia-vida de 34 e 2,5 dias, respectivamente (SCHIMMEL et al., 1983); a lambda-cialotrina exibe meia-vida variável de 0,23 a 0,53 dias, de acordo com a formulação, em águas de arrozais (GU et al., 2007). A bioresmetrina, a cipermetrina, a deltametrina e o fenvalerato exibiram meias-vidas que variaram de 1,2 a 2,2; 4,7 a 30,8; 0,5 a 0,8; 3,5 a 4,4 dias, respectivamente, em um modelo de

ecossistema de água doce (LUTNICKA; BOGACKA; WOLSKA, 1999). Já os piretroides lambda-cialotrina, cipermetrina, deltametrina e permetrina mostraram pouca persistência em solução aquosa durante 80 dias; sendo que nos primeiros 10 dias, há degradação de aproximadamente 80% do total dos compostos (Figura 3) (VIEIRA et al., 2007). De acordo com estes autores, a meia-vida estimada para os quatro piretroides é de cinco dias, em solução exposta à luz, com pH 6,5.

**Figura 2.** Persistência de dos piretroides lambda-cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água por 80 dias.



Fonte: Vieira et al., 2007.

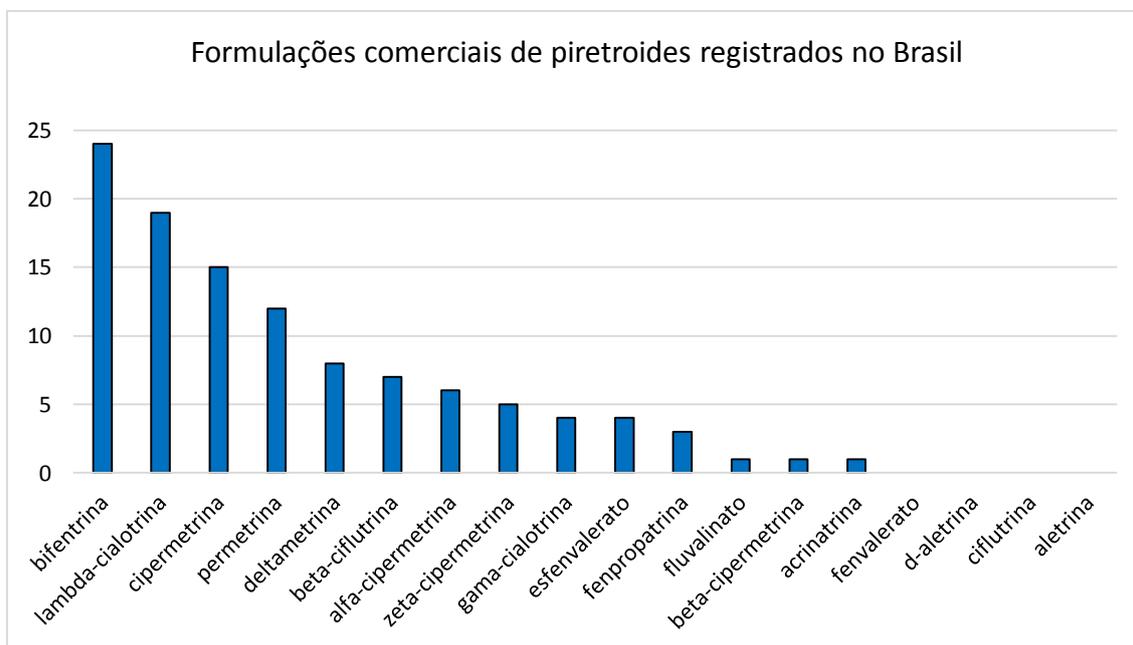
## 2.2. A utilização de piretroides no Brasil

Dada sua alta produtividade agrícola, o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos (ANVISA, 2008). De acordo com os Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IDS) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), os agrotóxicos mais utilizados no Brasil são os herbicidas, que perfazem mais de 50% do total, seguidos pelos inseticidas, fungicidas e acaricidas. No mesmo relatório, consta que, segundo a ANVISA, em 2008, o Brasil foi responsável pelo consumo de 86% do total de agrotóxicos vendidos na América Latina.

Com relação aos inseticidas, os ingredientes ativos mais utilizados eram o organoclorado endosulfan e os organofosforados acefato e metamidofós (IBGE, 2012), no entanto, em decorrência de processos de reavaliação, os três ingredientes ativos supracitados estão banidos no Brasil (ANVISA, 2013). Dessa forma, os inseticidas piretroides são uma alternativa e seu uso deve ser intensificado no país, em decorrência da ilegalidade na utilização destes organofosforados e organoclorados.

No Brasil, os piretroides são registrados para o controle de ectoparasitos em mamíferos de pequeno e grande porte, insetos na produção agrícola, insetos vetores e na segurança domissanitária (ANVISA, 2007a). Em outros países, estes inseticidas são registrados também para o controle de ectoparasitos em peixes (SCOTTISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998; 2008; HAYA, 2005). Entre os piretroides do tipo II, a cipermetrina, a deltametrina e a lambda-cialotrina são os ingredientes ativos com maior número de registros em produtos comerciais, segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2014). A lambda-cialotrina (LCH) é o piretroide do tipo II com maior número de produtos registrados no país, perfazendo 19 registros (Figura 4).

**Figura 3.** Quantidade de produtos comerciais registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, cujos ingredientes ativos são piretroides.



Fonte: Brasil, 2014.

A LCH é registrada no Brasil para uso agrícola (nas seguintes culturas: agrião, alface, algodão, alho, alho-poró, amendoim, arroz, aveia, batata, brócolis, café, cebola, cebolinha, cevada, citros, coentro, couve, couve-flor, feijão, figo, fumo, manga, melão, milho, morango, pastagens, pimentão, pepino, repolho, soja, sorgo, tomate, trigo e uva), domissanitário e para jardinagem (crisântemo e rosa) (ANVISA, 2007b; 2013a). Apesar do uso legal em diversas culturas, a LCH foi o piretroide mais utilizado de maneira irregular nas lavouras brasileiras em 2011, sendo detectado em 75 amostras, de um total de 589 amostras consideradas insatisfatórias (ANVISA, 2013b). A LCH mostrou-se eficaz no combate ao *Anopheles darlingi*, mosquito vetor da malária, em um estudo piloto realizado no estado de Rondônia (CHARLWOOD et al., 1995).

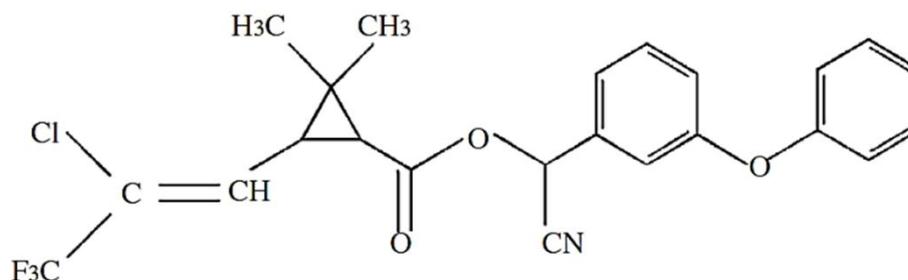
O ambiente aquático pode ser afetado pelo uso agrícola e domissanitário de piretroides. Na maioria das vezes, a contaminação aquática por pesticidas ocorre em pulsos de concentração elevada, especialmente se a pulverização em campo é seguida de precipitação; se os resíduos da utilização destes produtos são descartados

de maneira incorreta (NORUM et al., 2010) ou, ainda, em aplicações diretas na água a fim de controlar parasitos em criações comerciais de peixes. Os piretroides são eficazes para o último fim citado (US EPA, 2008; GEEST; BURRIDGE; KIDD, 2014), entretanto não há legislação no Brasil para uso de nenhum piretroide em aquicultura. Além disso, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na resolução 357, de 18 de Março de 2005 (BRASIL, 2005a), não estabelece concentrações aceitáveis de piretroides para nenhuma classe de águas. Na legislação brasileira, somente o Ministério da Saúde estabeleceu a concentração máxima de permetrina em água potável em  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (BRASIL, 2005b). No entanto, a permetrina é um piretroide do tipo I, o qual é menos tóxico do que piretroides do tipo II. Marino e Ronco (2005) e Belluta et al. (2010) relatam concentrações de cipermetrina no ambiente aquático na Argentina e no Brasil que podem atingir até  $194$  e  $111 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Como ressaltado anteriormente, nas atividades de aquicultura no Brasil não existe, até o presente, autorização oficial para uso de qualquer piretroide. Dessa forma, a utilização irregular desses produtos ou a contaminação secundária dos meios aquáticos torna-se preocupante não só em função da contaminação do meio ambiente como também pela possibilidade de prejuízos às populações de peixes em áreas contaminadas, bem como danos à saúde humana oriundos do consumo de animais contaminados.

### **2.3. Lambda-cialotrina**

A lambda-cialotrina (mistura de 1:1 de (Z)-(1R,3R)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzila e (Z)-(1S,3RS)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil) - 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (R)-alfa-ciano-3-fenoxibenzila) (LCH) é um piretroide do tipo II, apresentando, portanto, um grupo ciano em sua estrutura (Figura 5). Este inseticida foi relatado, pela primeira vez, em 1984, por Robson e Crosby (CASIDA; QUISTAD, 1998; HE et al., 2008).

**Figura 4.** Estrutura da lambda-cialotrina.

Fonte: Anadón et al., 2009.

A LCH é um sólido incolor, podendo apresentar-se amarelado em solução. Apresenta alto coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$  a 20°C = 7,00), tendendo, portanto, a se acumular em lipídeos. O vetor principal para o transporte desse piretroide em sistemas aquáticos é sua adsorção à matéria orgânica, fazendo com que o maior risco de exposição a organismos não-alvo seja a LCH presente nos sedimentos (HE et al., 2008). Este composto é estável em pH menor que 8; em condições alcalinas, ele é hidrolisado pelo ataque nucleofílico do íon hidroxila, formando um derivativo cianidrina, o qual se degrada gerando HCN e o aldeído correspondente (GUPTA et al., 1998).

A LCH é altamente tóxica para peixes e crustáceos. Segundo Maund e colaboradores, a concentração letal para 50% da população em 96 horas (CL50;96h) para peixes varia entre 0,078  $\mu\text{g L}^{-1}$  (*Leuciscus indus*) e 2,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  (*Poecilia reticulata*). Apesar da alta sensibilidade de peixes a este piretroide, aves são pouco sensíveis; porém abelhas melíferas apresentam alta susceptibilidade (HE et al., 2008).

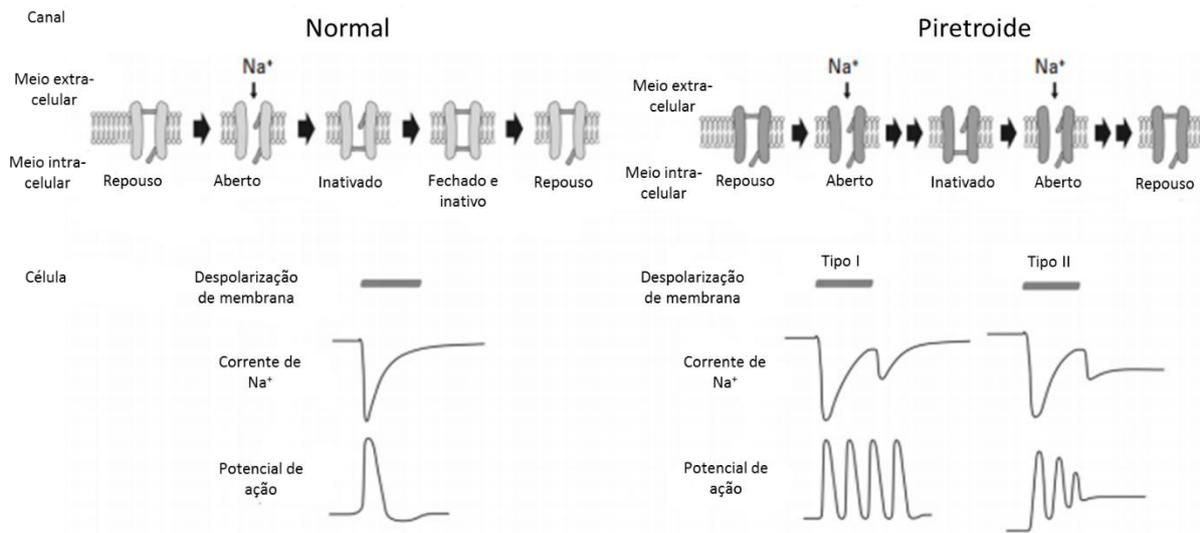
A eficácia dos piretroides em insetos é dependente da estereoquímica da molécula. Na LCH, a gama-cialotrina (GCH) é o isômero que apresenta efeito inseticida. Em peixes, produtos formulados contendo ambos os isômeros (LCH) ou apenas a GCH apresentam toxicidade semelhante; no entanto, em crustáceos, a LCH mostrou-se sete vezes mais tóxica do que a GCH (WANG et al., 2007).

No Brasil, esse piretroide é classificado como medianamente tóxico (classe toxicológica III), além de ser registrado para uso em diversas culturas (ANVISA, 2007b, 2013a). Apesar de sua ampla utilização e de diversos relatos na literatura acerca de sua toxicidade para organismos aquáticos (PINER; ÜNER, 2012, 2014; LI et al., 2014; TU et al., 2014), não há relatos sobre a concentração de LCH em águas brasileiras, bem como legislações sobre concentrações máximas permitidas nas diferentes classes de água.

#### **2.4. Mecanismo de ação dos piretroides**

Os piretroides exercem sua toxicidade através de interações com os canais de sódio neuronais. De forma breve, esses compostos induzem descargas elétricas repetitivas, medidas tanto como um aumento na atividade espontânea ou como uma descarga de potenciais de ação advindos de um único estímulo elétrico, seguido por um bloqueio do canal e conseqüente não repolarização da membrana (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989).

Nos axônios, os canais de sódio se abrem brevemente para facilitar a despolarização da membrana, constituindo assim um potencial de ação que é propagado pelo neurônio. Os inseticidas piretroides se ligam a um receptor no canal de sódio do neurônio, impedindo seu fechamento total. Assim, o constante fluxo de íons de sódio cria um estado de repouso menos estável, e o neurônio fica susceptível às descargas repetitivas do nervo, o que leva à hiperatividade, tremores e tetania (Figura 6) (NARAHASHI et al., 1998; COATS, 2008). De acordo com Narahashi (1996), se apenas aproximadamente 1% do total de canais de sódio for modificado por piretroides, já ocorrem sintomas severos de hiperexcitabilidade em animais.

**Figura 6.** Efeito de piretroides na excitabilidade neuronal.

A despolarização abre os canais de  $\text{Na}^+$ , permitindo a entrada do íon na célula. Para limitar a entrada de  $\text{Na}^+$  e o comprimento da despolarização, os canais são inativados e tem que retornar ao estado de repouso antes da próxima abertura. Os piretroides inibem essa função de duas formas: atrasando a inativação dos canais e permitindo um fluxo contínuo de  $\text{Na}^+$ . Ao avaliar a corrente de íons através da célula, a despolarização leva a uma rápida inativação sob condições normais. Quando a célula está intoxicada pelo piretroide, os canais permanecem abertos quando a despolarização acaba, gerando assim uma corrente não terminada. Quando a voltagem da membrana é avaliada, a despolarização sob condições normais gera um único potencial de ação, ao passo que, na presença de piretroides do tipo I, a despolarização ocorre acima do limite para a geração de um potencial de ação, resultando em uma série de potenciais de ação. Já na presença de um piretroide do tipo II, ocorre uma maior despolarização de membrana, diminuindo o gradiente eletroquímico do  $\text{Na}^+$  e a amplitude do potencial de ação subsequente. *Fonte:* adaptado e traduzido de Shafer et al. (2005).

As diferentes síndromes observadas na intoxicação pelos dois tipos de piretroides podem ocorrer devido à ação diferenciada desses compostos nos canais de  $\text{Na}^+$  voltagem-dependentes. De forma geral, os piretroides do tipo I prolongam o tempo de abertura dos canais o suficiente para causar descargas repetitivas, enquanto que os do tipo II mantém esses canais abertos por períodos tão longos, que a geração de novos potenciais de ação não é mais possível (SHAFER; MEYER; CROFTON, 2005). Uma característica importante dos efeitos de piretroides nos canais de sódio é que a amplitude e a duração da corrente gerada são independentes. A amplitude da

corrente depende apenas da proporção de canais de sódio que foi modificada, exibindo assim uma relação sigmoïdal com a dose de piretroide utilizada. Já a duração da corrente depende apenas da estrutura do composto, visto que piretroides do tipo I mantêm os canais abertos por períodos mais curtos que os piretroides do tipo II (RAY; FRY, 2006).

Segundo Breckenridge e colaboradores (2009), embora existam ações tóxicas comuns a todos os piretroides, os pertencentes ao tipo I provocam efeitos tóxicos quantitativamente e qualitativamente diferentes dos compostos do tipo II, tanto em relação aos canais iônicos, como em níveis macroscópicos de organização no que tange aos tecidos eletricamente condutores (nervo-músculo, hipocampo, neurônios corticais) e, finalmente, no animal como um todo, onde respostas toxicológicas significativas e efeitos adversos não observados podem ser caracterizados.

Após serem modificados por piretroides, os canais de sódio ainda exibem muitas funções normais, como a seletividade por íons de Na<sup>+</sup>, a condutância e também o potencial de membrana, embora alterado para um estado de constante excitabilidade. Dessa forma, após a exposição a níveis moderados de piretroides, as células podem continuar a funcionar, contudo, em um novo estado de hiperexcitabilidade. Em insetos, esse processo é conhecido como *knock down*, o qual é um efeito sub-letal, porém, incapacitante (RAY; FRY, 2006).

Além dos canais de sódio, os piretroides podem exercer sua toxicidade em outros canais iônicos, como os canais de cloreto e de cálcio. Os canais de cloreto são encontrados em cérebro, nervos, músculo e glândulas salivares, e controlam a excitabilidade celular juntamente com o sódio. Em experimentos realizados com mamíferos, Forshaw e colaboradores (2000) identificaram os canais de cloreto voltagem-dependentes como importantes sítios de ação de toxicidade da deltametrina, um piretroide tipo II típico; todavia, esses canais não se mostraram importantes na intoxicação por um piretroide do tipo I, a cismetrina. Apesar desses resultados, Burr e Ray (2004) afirmam que os canais de cloreto não devem ser considerados atuantes

nas diferenças observadas nas síndromes advindas da intoxicação por piretroides de tipo I e II. Os canais de cálcio estão presentes nas membranas excitáveis e modulam vários eventos celulares, tais como a liberação de neurotransmissores, ajustes metabólicos, proliferação celular, contração muscular e controle de expressão gênica (SODERLUND et al., 2002). Alguns estudos observaram a ação de piretroides tipo I e II nesses canais (YABU et al., 1989; HILDEBRAND et al., 2004); entretanto, Shafer e Meyer (2004) ressaltam que a maior parte desses estudos foi realizada *in vitro*, o que limita a interpretação desses resultados e a extrapolação dos mesmos para efeitos *in vivo*. Esses autores avaliam que são necessários mais estudos para que se possa afirmar a importância desses canais na intoxicação por piretroides.

Os piretroides também podem atuar nos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA). Esses receptores atuam como mediadores da neurotransmissão inibitória em mamíferos. A liberação de GABA pelos nervos pré-sinápticos ativa um canal de cloreto na membrana pós-sináptica, levando à hiperpolarização do nervo pós-sináptico; assim é preciso uma maior ação excitatória para que possa ocorrer a excitação do neurônio pós-sináptico (SODERLUND et al., 2002). Dessa forma, os receptores GABA ativos dificultam a despolarização da membrana, exercendo um papel inibitório no sistema nervoso central. Um dos mecanismos propostos para a ação dos piretroides nos receptores GABA é que eles atuam nos canais de cloreto do complexo receptor-ionóforo GABA (COATS, 1990). Estudos eletrofisiológicos sugerem que o efeito de piretroides nas vias GABAérgicas são consistentes com um aumento da inibição, possivelmente como resultado de excitações pré-sinápticas mediadas por canais de sódio, ao invés de serem fruto de inibição antagônica, que é típica de bloqueadores dos canais de cloreto no complexo receptor-ionóforo GABA (SODERLUND et al., 2002).

De acordo com Haya (1989), a toxicidade seletiva dos piretroides em vertebrados, em ordem decrescente de sensibilidade é a seguinte: peixes > anfíbios ≥ mamíferos > aves. Dentre os invertebrados, os artrópodes, que são os organismos-alvo

da ação de piretroides, apresentam maior sensibilidade. Visto que os vertebrados mais sensíveis a esses compostos vivem no ambiente aquático e, que, nesse mesmo ambiente, há um grande número de artrópodes essenciais à manutenção das cadeias alimentares aquáticas, o estudo da relação entre piretroides e o meio aquático é indispensável para que os riscos da utilização desses xenobióticos ao meio ambiente sejam minimizados.

## **2.5. Piretroides no ambiente aquático**

Além do uso específico na aquicultura, o ambiente aquático pode ser contaminado por piretroides devido ao uso agrícola desses compostos. A lixiviação, a absorção pelo solo até os lençóis freáticos, o espalhamento causado pelo vento durante a aplicação e a deposição atmosférica são vias pelas quais esses e outros agroquímicos alcançam os corpos d'água. Este quadro é agravado quando a aplicação desses agroquímicos é seguida de chuvas. Outrossim, os piretroides são amplamente utilizados para controle de pragas domésticas e em jardinagem, o que também contribui para a presença desses xenobióticos no ambiente aquático. Quando há o emprego desses inseticidas para o combate de insetos vetores, a direção e velocidade do vento podem também levar os piretroides a terem contato com cursos d'água.

A contaminação aquática tem se tornado um grande problema de ordem ambiental, visto que esse ambiente age como receptor de contaminantes provenientes de diversos usos. No entanto, como tais usos são sazonais e periódicos, a entrada de pesticidas na água é intermitente. Dessa forma, os peixes e outros organismos não-alvo que habitam locais passíveis de contaminação, são expostos em pulsos, seguindo-se períodos de permanência em locais não contaminados, onde podem se recuperar dos danos causados pela interação com o xenobiótico (GUILHERME et al., 2014).

Em 2005, Weston e colaboradores ressaltaram a importância de estudos que monitorassem a toxicidade aquática proveniente do uso residencial de piretroides.

Segundo os autores, o órgão norte-americano responsável pelo monitoramento das redes de esgoto fiscalizava apenas a concentração de permetrina em sedimentos, o que não refletia os possíveis efeitos do amplo uso residencial de piretroides. As principais conclusões deste estudo evidenciaram a grande contaminação de afluentes resultantes do uso doméstico de piretroides, principalmente quando as concentrações encontradas foram comparadas com corpos d'água afetados por resíduos agrícolas, sendo que os compostos mais encontrados na área estudada (Roseville, Califórnia – EUA) foram a bifentrina, ciflutrina e cipermetrina.

Na região do Vale Central, na Califórnia (EUA), foram encontrados piretroides em 75% das amostras de sedimento de canais de irrigação e pequenos afluentes (WESTON et al., 2004). Os produtos mais encontrados, em ordem decrescente, foram a permetrina, o esfenvalerato, a bifentrina, e a lambda-cialotrina. De acordo com os autores, as concentrações ambientais de piretroides observadas nesse estudo são tóxicas para comunidades bentônicas, podendo causar prejuízos ecológicos.

Concentrações de 0,11 a 0,14  $\mu\text{g L}^{-1}$  de LCH foram encontradas em microbacias próximas à áreas agrícolas em Stanislaus County, Califórnia (EUA); e o mesmo piretroide foi observado em sedimentos de Imperial, Monterey, Stanislaus e Placer Counties, Califórnia (EUA), em concentrações de 0,003 a 0,315  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco (STARNER, 2007 *apud* HE et al., 2008).

O uso de piretroides para tratamento de ectoparasitos em peixes é permitido em alguns dos maiores produtores de salmão do mundo, como a Noruega e a Escócia. No Canadá, apenas um estado obteve um registro temporário para utilização de piretroides com essa finalidade (BURRIDGE et al., 2010; GEEST; BURRIDGE; KIDD, 2014). Tanto a cipermetrina (Excis<sup>®</sup> e Betamax<sup>®</sup>) como a deltametrina (Alphax<sup>®</sup>) são utilizadas em tratamentos tópicos contra piolho-do-mar em salmão. A dose recomendada varia de 2 a 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  para tratamentos que duram de 30 a 60 minutos (SEPA, 1998). Esses compostos são, indubitavelmente, bastante eficazes contra artrópodes, ao passo que outras espécies de invertebrados, como moluscos,

apresentam menor sensibilidade (BURRIDGE et al., 2010). Apesar dessa eficiência, estudos relatam que as concentrações empregadas no tratamento de salmões são tóxicas à biota circundante (CLARK et al., 1987; ERNST et al., 2001). Geest e colaboradores (2014) sugerem que os efeitos em invertebrados bentônicos provenientes do uso de deltametrina e cipermetrina em criações de salmão dependem da magnitude e extensão do acúmulo do pesticida no sedimento, o que seria influenciado pela frequência de tratamento e pelas condições físico-químicas e oceanográficas do local.

Não obstante a regulamentação do uso de piretroides para tratamento de peixes, esses animais são muito sensíveis a estes xenobióticos, e grandes mortalidades de peixes foram atribuídas à presença de piretroides na água. Em 1991, 300 toneladas de enguias (*Anguilla anguilla*) foram encontradas mortas no lago Balaton, na Hungria (BÁLINT et al., 1997). Em 1995, no mesmo lago, 30 toneladas de enguias morreram. Em ambos os episódios, observou-se grande concentração de deltametrina nos tecidos dos peixes moribundos, assim como em outros animais e no sedimento do lago. Os autores do estudo atribuíram a devastação populacional aos efeitos deste piretroide.

Os efeitos tóxicos de piretroides e outros poluentes em organismos não-alvo nem sempre levam à morte, mas podem causar efeitos sub-letais. Tais efeitos são uma ameaça às populações, dado que podem interferir no desempenho dos animais, afetando comportamentos que podem colocar em risco a espécie, em longo prazo. Segundo Selye (1956), citado por Beyers e colaboradores (1999), quando um organismo é exposto a estressores, como xenobióticos, ocorre a síndrome de adaptação geral: primeiro há um alarme fisiológico, em que os efeitos do tóxico perturbam a homeostase do organismo. Após essa fase, há a de resistência, que ocorre quando a adaptação ao estressor já foi alcançada e as modificações fisiológicas passam a ser parte do dispêndio normal de vida do animal. Se a dose e a extensão da exposição forem suficientes, ocorre a terceira fase, que é a de exaustão,

a qual culmina na morte do indivíduo. As duas primeiras fases podem ser avaliadas e identificadas prematuramente, com o intuito de evitar que ocorra a morte do animal. Por conseguinte, análises que identifiquem essas respostas são importantes na preservação da homeostase de indivíduos e na manutenção das populações.

## **2.6. Biomarcadores e efeitos de piretroides em peixes**

Avaliações que reconheçam efeitos prejudiciais de poluentes no ambiente aquático são desejáveis para que se possa preservar o equilíbrio ecológico das comunidades de um determinado habitat. Além da observação das características físico-químicas da água, a análise de tecidos, fluidos corporais, metabólitos e do comportamento dos organismos que habitam locais sujeitos à contaminação por xenobióticos pode fornecer informações essenciais para o conhecimento das consequências desses produtos em populações. Modificações nos chamados biomarcadores associam os efeitos da exposição a contaminantes com as avaliações de risco ambiental.

Há inúmeras definições para o termo biomarcador. No entanto, de forma sucinta, esse termo pode ser entendido como as avaliações que refletem interações entre um sistema biológico e algum fator gerador de risco, o qual pode ser físico, químico ou biológico (WHO, 1993). De acordo com a mesma instituição, os biomarcadores podem ser subdivididos em três classes: i) biomarcadores de exposição, que detectam e medem substâncias exógenas ou seus metabólitos ou, ainda, o produto da interação entre um xenobiótico e células-alvo em partes de um organismo; ii) biomarcadores de efeito incluem as alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em tecidos ou fluidos corporais, advindas da interação com o xenobiótico, que podem ser associadas a prejuízos na saúde do animal; iii) biomarcadores de susceptibilidade, os quais indicam a capacidade de resposta de um organismo frente a determinado xenobiótico, incluindo fatores genéticos e

modificações em receptores, que podem modificar a susceptibilidade do organismo à exposição.

Essa divisão tem fins didáticos, dado que muitos dos biomarcadores podem ser incluídos em mais de uma subdivisão. Contudo, há um consenso acerca da importância da avaliação desses sinais, os quais fornecem respostas iniciais da contaminação por xenobióticos. Os biomarcadores, quando avaliados em condições de laboratório, atuam como ligações entre a toxicidade observada em condições controladas e a que ocorre no ambiente natural, permitindo a previsão de riscos potenciais.

Os piretroides são extremamente tóxicos para peixes, visto que essa classe de xenobióticos é letal em concentrações 10 a 1000 vezes menores que para outros animais, tais como aves e mamíferos (KÖPRÜCU; AYDIN, 2004). Há algumas hipóteses para esta alta sensibilidade de peixes à intoxicação por piretroides, como a falta de maquinaria enzimática adequada para biotransformação e eliminação destes compostos (DEMOUNTE, 1989; HAYA, 1989; WHEELLOCK et al., 2005) e a alta afinidade dos canais de sódio de peixes aos piretroides (HAVERINEN; VORNANEN, 2014). Além disso, os sintomas associados à intoxicação aguda de peixes por esses xenobióticos sugerem que além do sistema nervoso, as áreas respiratórias e a regulação iônica renal são mecanismos envolvidos na ação letal de piretroides em peixes (HAYA, 1989).

A seguir, serão apresentados alguns biomarcadores de exposição e efeito em organismos aquáticos oriundos da exposição a piretroides.

### ***Biomarcadores hematológicos***

Os fatores hematológicos são biomarcadores relativamente recentes no estudo das interações entre peixes e xenobióticos, visto que há dificuldades na interpretação de hemogramas de um grupo de animais tão variado e extenso, aliado a falta de intervalos de referência nos quais as interpretações dos dados se baseiem (CLAUSS et al., 2008). No entanto, essas dificuldades são superadas quando o número de

animais utilizados em teste é considerado; como as amostras de sangue podem ser regularmente obtidas dos organismos teste, essa abordagem é tida como não-invasiva e pode diminuir consideravelmente a quantidade de peixes utilizada em avaliações ecotoxicológicas. As respostas hematológicas não são específicas a xenobióticos, porém podem fornecer informações importantes acerca da interação entre os peixes e os poluentes encontrados no meio aquático, assim como as condições gerais de saúde desses animais (OOST et al., 2003). Efeitos tóxicos de xenobióticos no tecido eritropoiético podem diminuir o número de eritrócitos e, conseqüentemente, a concentração de hemoglobina, o que é indicativo de anemia e pode, em casos extremos, levar à morte do animal (KÖPRÜCÜ et al., 2006).

As variáveis hematológicas incluem a porcentagem de volume sanguíneo formada por células vermelhas (hematócrito, Ht), a contagem de células vermelhas por volume de sangue (RBC) e a concentração de hemoglobina (Hb). Esses índices são medidos diretamente e subsidiam o cálculo de índices secundários, como o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (SCHLENK et al., 2008).

Embora não sejam biomarcadores específicos, como ressaltado anteriormente, os piretroides causam desordens hematológicas em peixes. Saxena e Seth (2002) observaram diminuição do RBC, Hb e Hb em *Channa punctatus* expostos à cipermetrina; alevinos de *Labeo rohita* expostos ao mesmo piretroide também apresentaram diminuição do RBC e Hb (DAS; MUKHERJEE, 2003), ao passo que *Rhamdia quelen* expostos também à cipermetrina apresentaram aumento apenas na Hb e na HCM (BORGES et al., 2007). A exposição à deltametrina causou aumento do RBC, de Hb e Ht em *Oreochromis niloticus* (EL-SAYED; SAAD; EL-BAHR, 2007); o mesmo piretroide provocou os mesmos efeitos em *Oncorhynchus mykiss* (VELISEK et al., 2007). Em *Catla catla* exposto à deltametrina observou-se diminuição de RBC e de Hb (VANI et al., 2012).

### **Osmorregulação**

Nos organismos aquáticos, a manutenção de um equilíbrio iônico interno é de suma importância para o balanço entre a entrada de água e a saída de íons. A captação de água nos teleósteos de água doce é balanceada através de altas taxas de filtração glomerular e do fluxo de urina, sendo que a perda de sais advinda desses processos é compensada por meio da reabsorção tubular dos íons necessários. A perda de íons na urina e por difusão através das brânquias é balanceada por mecanismos ativos de captação existentes no epitélio branquial, além do ganho iônico que ocorre através da alimentação (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005). Os íons inorgânicos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  têm papel essencial em funções metabólicas e fisiológicas; o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  são os principais cátion e ânion do fluido extracelular, ao passo que o  $\text{K}^+$  é o cátion principal do fluido intracelular (SATHYA et al., 2012).

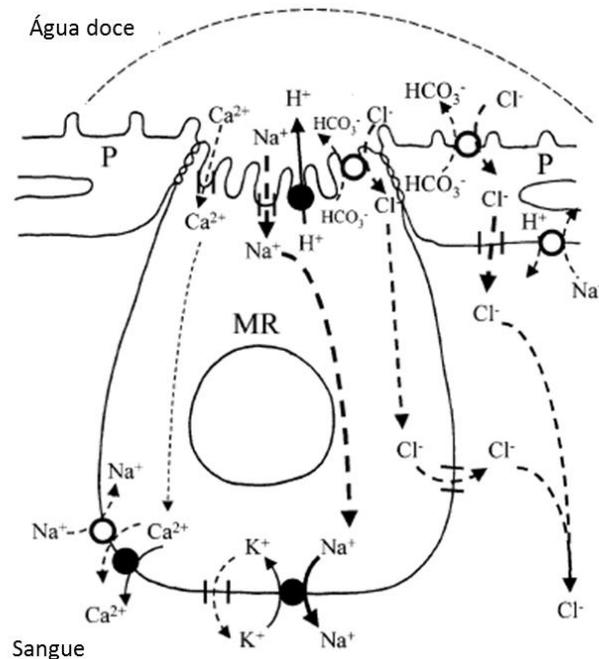
Os eletrólitos plasmáticos perfazem a maior parte das partículas osmoticamente ativas, além de exercerem importantes funções, como proporcionar sistemas tampão e os mecanismos para o equilíbrio ácido-base. Além disso, esses íons fornecem o balanço iônico adequado e necessário para as funções tissulares, especialmente nas porções neuromusculares (SUVETHA; RAMESH; SARAVANAN, 2010).

Desequilíbrios iônicos em peixes podem levar a danos às funções fisiológicas de peixes. Segundo Evans (1990), os peixes possuem problemas crônicos no balanço hídrico e de sais, devido aos gradientes iônicos e osmóticos que atuam através do fino epitélio branquial. Os peixes são extremamente sensíveis a tóxicos presentes na água, tendo em vista que estes afetam as brânquias ao aumentar a permeabilidade do epitélio branquial à água e aos íons, além de inibir a atividade de troca iônica das células cloreto (CC) (BONGA; LOCK, 1992).

As ATPases são enzimas altamente conservadas, desempenham um importante papel nos transportes de membrana, inclusive nos transportes iônicos (REDDY; PHILLIP, 1994), e podem ser consideradas indicadores de toxicidade

(YADWAD et al., 1990). A absorção de  $\text{Na}^+$  através da membrana basolateral é realizada pela  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (NKA), a qual está presente em praticamente todas as células animais; esta enzima está presente em maiores concentrações em teleósteos marinhos e em níveis basais nos teleósteos de água doce (MARSHALL, 2002). A NKA atua na osmoregulação de peixes, principalmente no que tange à homeostase iônica em nível celular e de organismo. A Figura 7 é uma representação esquemática dos transportes iônicos que ocorrem nas brânquias de peixes de água doce.

**Figura 7.** Modelo da absorção de íons em peixes de água doce.



MR – células ricas em mitocôndrias, P – células pavimentosas. As linhas cheias indicam transporte ativo, linhas pontilhadas indicam difusão ou trocas através de canais de membranas ou através das células. Bombas de ATPase estão representadas por círculos sólidos; co-transportadores e trocadores, por círculos abertos; canais iônicos por linhas paralelas. A absorção de  $\text{Na}^+$  é completada na membrana basolateral pela NKA. O  $\text{K}^+$  bombeado para dentro da célula pela NKA é reciclado pelos canais presentes na membrana basolateral. A absorção de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre pela  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase e pelas trocas de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Trocas de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  na membrana basolateral previnem a acidificação do citosol e o  $\text{Cl}^-$  é translocado através da membrana basolateral pelos canais aniônicos. *Fonte:* adaptado e traduzido de Marshall (2002).

As respostas iônicas de peixes provenientes da intoxicação à piretroides são relatadas na literatura. Em exposição aguda à cipermetrina, a carpa *Cyprinus carpio* apresenta diminuição nas concentrações plasmáticas de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, concomitantemente à inibição da NKA branquial (SUVETHA; RAMESH; SARAVANAN, 2010). A exposição ao mesmo piretroide também provoca inibição da NKA branquial em *Cirrhinus mrigala* (PRASHANTH; DAVID, 2010), enquanto que *Clarias batrachus* expostos à deltametrina exibem diminuição nas concentrações iônicas em diferentes tecidos (KUMAR, 2012a).

### **Biomarcadores de neurotoxicidade**

Como ressaltado anteriormente, a base dos efeitos toxicológicos de piretroides em animais é a interação desses xenobióticos com os canais de sódio voltagem-dependentes, o que caracteriza um efeito neurotóxico. Além disso, como discutido na seção 2.4, os piretroides podem, ainda, interagir com outros canais iônicos, como os canais de cálcio, cloreto e os GABAérgicos. Diversos estudos observaram uma correlação confiável entre a concentração de piretroides no cérebro e os sinais de toxicidade e/ou letalidade (HAYA, 1989).

Uma das atividades enzimáticas mais utilizadas para a avaliação de neurotoxicidade em peixes é a acetilcolinesterase (AChE). Visto que essa enzima é o alvo de inseticidas organofosforados e carmabatos, esse biomarcador é amplamente empregado em toxicologia aquática e um dos biomarcadores mais antigos (PAYNE et al., 1996, PINER; ÜNER, 2014). A AChE é uma enzima chave no processo de transmissão do impulso nervoso, sendo responsável pela hidrólise da acetilcolina em acetato e colina. Durante a transmissão normal do impulso nervoso, a acetilcolina é liberada na sinapse para excitar um receptor. Se ela não for rapidamente hidrolisada, a célula pós-sináptica será constantemente excitada, resultando em estimulação contínua, o que pode levar à tetania, paralisia e até a morte do animal.

A inibição dessa enzima pode ser prejudicial aos peixes, visto que comportamentos que dependem do funcionamento adequado do sistema nervoso

podem ser afetados. De acordo com Wolansky e Harril (2008), a função motora é um comportamento prejudicado por todos os piretroides, independentemente da espécie exposta; assim esse biomarcador pode ser útil no entendimento dos mecanismos de toxicidade desses xenobióticos.

Para Badiou e Belzunces (2008), os efeitos inibitórios de piretroides na atividade da AChE podem ser provenientes de mecanismos distintos: i) a modulação da biossíntese da AChE através do aumento dos níveis de secreção da forma solúvel, diminuindo assim a AChE destinada às membranas celulares e ii) pela clivagem da âncora de fosfatidilinositol da AChE através da fofolipase fosfatidilinositol específica endógena. De acordo com esses autores, essa atividade enzimática é um biomarcador robusto de exposição à piretroides em abelhas (*Apis mellifera*) e, de acordo com Toumi e colaboradores (2015), isso também se aplica ao cladócero *Daphnia magna*.

Há diversos estudos acerca da exposição de peixes à piretroides e modificações na atividade da AChE. Piner e Üner (2014) observaram inibição na atividade da AChE cerebral de *O. niloticus* expostos à LCH; a deltametrina causa o mesmo efeito em *C. carpio*, *Poecilia reticulata* e *Piaractus mesopotamicus* (BÁLINT et al., 1995; MOREIRA et al., 2010; ROSSI, 2013). No entanto, *C. carpio* não apresenta modificações nessa atividade enzimática quando expostos à deltametrina (ENSIBI et al., 2014). Embora as respostas da AChE em peixes expostos à piretroides não sejam congruentes, a avaliação dessa atividade enzimática pode ser útil no entendimento dos mecanismos de ação desse xenobióticos.

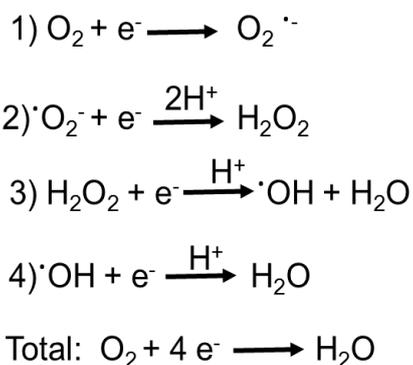
### **Metabolismo antioxidante**

A produção de radicais livres é parte essencial da vida aeróbica; na maioria das vezes esses radicais são produzidos como produtos do metabolismo de oxigênio. Os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que possuem elétrons desemparelhados, os quais são muito reativos e podem participar de uma ampla variedade de reações químicas (DI GIULIO et al., 1989; LUSHCHAK, 2011). Os radicais livres podem derivar do oxigênio, sendo espécies reativas de oxigênio (ERO),

as quais incluem radicais como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o ácido hidropoxila ( $HO_2^{\bullet}$ ), o hidroxil ( $\bullet OH$ ), o carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ), o peroxil ( $RO_2^{\bullet}$ ) e o alcóxil ( $RO^{\bullet}$ ). Algumas espécies não radicais também são descritas como ERO, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ácido hipocloroso ( $HClO$ ), hidropéroxidos de ácidos graxos ( $FAOOH$ ), aldeídos reativos, oxigênio *singlet* e outros compostos (LUSHCHAK, 2011).

A capacidade do  $O_2$  de ser um aceptor de elétrons é extremamente útil aos organismos aeróbicos, visto que uma das funções chave dessa molécula é servir como aceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, reação essa que produz o ATP (adenosina trifosfato). Neste processo, o  $O_2$  é reduzido a  $H_2O$ , reação essa que é um processo redutor de 4 elétrons em sequência, gerando produtos de um, dois e três elétrons. As equações a seguir exemplificam essa reação (Figura 8):

**Figura 8.** Reações de redução do  $O_2$ . Os produtos de um, dois e três elétrons formados nos passos 1, 2 e 3 da equação, mostram o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, respectivamente.



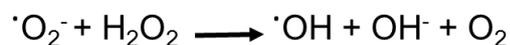
Fonte: a autora.

A existência de elétrons não pareados tende a fazer com que os radicais livres sejam extremamente reativos, embora essa reatividade possa variar de acordo com a molécula (DI GIULIO; MEYER, 2008).

Apesar de o  $H_2O_2$  não ser um radical, ele é um importante ERO por ser um precursor do  $\bullet OH$ , através de reação com o  $O_2^{\bullet-}$ , como esquematizado na Figura 9. Essa reação foi postulada pela primeira vez por F. Haber e T. Weiss em 1934 e ficou

conhecida como reação de Haber-Weiss. Essa reação pode ser catalisada por metais de transição como o ferro, cobre, cromo, mercúrio e arsênico (LUSHCHAK, 2011).

**Figura 5.** Reação de Haber-Weiss.



*Fonte:* a autora.

A oxidação de lipídeos é a ocorrência mais estudada no que tange à pesquisa de radicais livres, especialmente em organismos aquáticos, visto que estes possuem grandes quantidades de lipídeos com resíduos de ácidos graxos poli-insaturados, possíveis substratos para a oxidação. Como os lipídeos são oxidados pela formação de peróxidos, essas reações são denominadas de peroxidação lipídica (LPO) (LUSHCHAK, 2011). Quando um radical livre reage com um não radical, um novo radical é formado, caracterizando assim uma reação em cadeia. A LPO é iniciada por grandes quantidades de ERO e esse evento diminui a fluidez da membrana, facilita a troca de fosfolipídeos entre as duas partes da bicamada lipídica da membrana, aumenta a permeabilidade da membrana a substâncias que normalmente só a atravessam por canais específicos (como por exemplo, o  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^+$ ), além de danificar proteínas de membrana, inativando assim receptores, enzimas e canais iônicos (HALLIWELL, 2006). A oxidação continuada das cadeias lipídicas pode levar à perda da integridade da membrana; ademais os produtos da peroxidação lipídica têm efeitos prejudiciais diretos. Os isoprostanos, os quais são peróxidos cíclicos formados de ácidos graxos poli-insaturados com pelo menos três ligações duplas, podem agir como vasoconstritores e danificar tecidos. Aldeídos, como o malondialdeído, formados pela decomposição dos peróxidos de lipídeos podem atacar a molécula de DNA, dando origem a mutações (HALLIWELL, 2006).

Posto que a geração de ERO é inerente à vida aeróbica, como destacado anteriormente, e grande quantidade dessas moléculas podem causar danos, os organismos aeróbicos desenvolveram diversos mecanismos que podem minimizar

esses efeitos prejudiciais das ERO. Tais mecanismos incluem sistemas enzimáticos e não-enzimáticos (ou de baixo peso molecular) de defesa. Dentre as defesas enzimáticas, destacamos as superóxido dismutases (SOD), as catalases (CAT) e as glutationas peroxidases e transferases (GPx e GST, respectivamente).

A SOD acelera a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ , aceitando um elétron de um superóxido e o passando a outro, de acordo com a reação representada na Figura 10. O peróxido de hidrogênio formado também é transformado em outras reações enzimáticas, como será exposto posteriormente.

**Figura 10.** Reação catalisada pela enzima superóxido dismutase.



*Fonte:* a autora.

Praticamente todos os organismos aeróbicos possuem SOD, sendo que os vertebrados apresentam diversas formas dessa enzima. Ademais, o fato de que a SOD catalisa uma reação que é rápida sem a enzima, mostra a importância da transformação do radical superóxido em um não-radical (DI GIULIO; MEYER, 2008). Os animais possuem três formas distintas de SOD: associadas ao manganês (MnSOD), as quais se encontram na matriz mitocondrial; associadas ao cobre/zinco (CuZnSOD), localizadas no espaço intermembranas das mitocôndrias; e a forma extracelular, a qual também é uma forma de CuZnSOD, porém de maior peso molecular (HALLIWELL, 2006; DI GIULIO; MEYER, 2008).

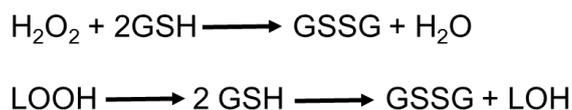
Como o  $H_2O_2$  formado após a reação da SOD também apresenta efeitos prejudiciais, as CAT e as GPx metabolizam essa molécula. No caso da CAT, seu substrato é restrito ao  $H_2O_2$ , e a reação está representada na Figura 11.

**Figura 11.** Reação catalisada pela enzima catalase.

*Fonte:* a autora.

A principal localização celular da CAT em vertebrados é nos peroxissomos; essas organelas atuam na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, sendo que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um subproduto deste processo. Dessa forma, a CAT protege os peroxissomos, além de impedir a migração dessas moléculas para outros locais da célula (DI GIULIO; MEYER, 2008). Embora alguns autores não considerem a atividade da CAT como um bom biomarcador de estresse oxidativo (OOST et al., 2003), devido à divergência das respostas dessa enzima frente a estressores, tal atividade enzimática é amplamente estudada no estresse oxidativo em organismos aquáticos.

A GPx também atua na metabolização do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no entanto, o espectro de ação dessa enzima é mais amplo do que aquele da CAT, estendendo-se à redução de peróxidos de ácidos graxos. Essa enzima é reconhecida como uma das defesas antioxidantes mais importantes dos organismos (DI GIULIO et al., 1989). As reações catalisadas pelas GPx envolvem a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ao seu álcool correspondente, juntamente com a oxidação de glutathiona reduzida (GSH), a glutathiona dissulfeto (GSSG); a GSSG formada é rapidamente reduzida na presença de NADPH e glutathiona redutase, às custas da oxidação estequiométrica do NADPH. No caso do peróxido de hidrogênio, o álcool correspondente é a água, ao passo que no caso dos peróxidos de lipídeos (LOOH), é o álcool do lipídeo correspondente (LOH) (DI GIULIO et al., 1989; HALLIWELL, 2006; DI GIULIO; MEYER, 2008). As reações catalisadas pela GPx estão representadas na Figura 12.

**Figura 12.** Reações catalisada pela enzima glutathiona peroxidase.

Fonte: a autora.

Em mamíferos, foram identificadas pelo menos 4 isoformas de GPx selênio-dependentes, a maioria tetramérica: a GPx1 é tida como a enzima clássica; a GPx2 está presente no trato gastrointestinal; a GPx3 é plasmática e a GPx4 é denominada glutathiona peroxidase hidroperóxido de lipídeo (HPGPx), a qual é monomérica (HALLIWELL, 2006; DI GIULIO; MEYER, 2008).

A glutathiona-S-transferase atua na biotransformação de xenobióticos, conjugando-os com a glutathiona, promovendo a desintoxicação do organismo (RICHARDSON et al., 2008). Além disso, a GST tem papel determinante nos mecanismos de defesa antioxidante pois, além de complementar o papel da glutathiona peroxidase na redução de hidroperóxidos, também protege a célula dos produtos finais tóxicos da peroxidação lipídica (SHARMA et al., 2004). No entanto, a GST atua como peroxidase apenas em LOOH, e não em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, outrossim, segundo Halliwell e Gutteridge (1999), o papel dessa enzima *in vivo* ainda é obscuro.

Com relação aos antioxidantes não enzimáticos, podemos citar os solúveis em água, como a glutathiona reduzida (GSH) e o ácido ascórbico, e os lipossolúveis, como os carotenoides, o retinol e o  $\alpha$ -tocoferol.

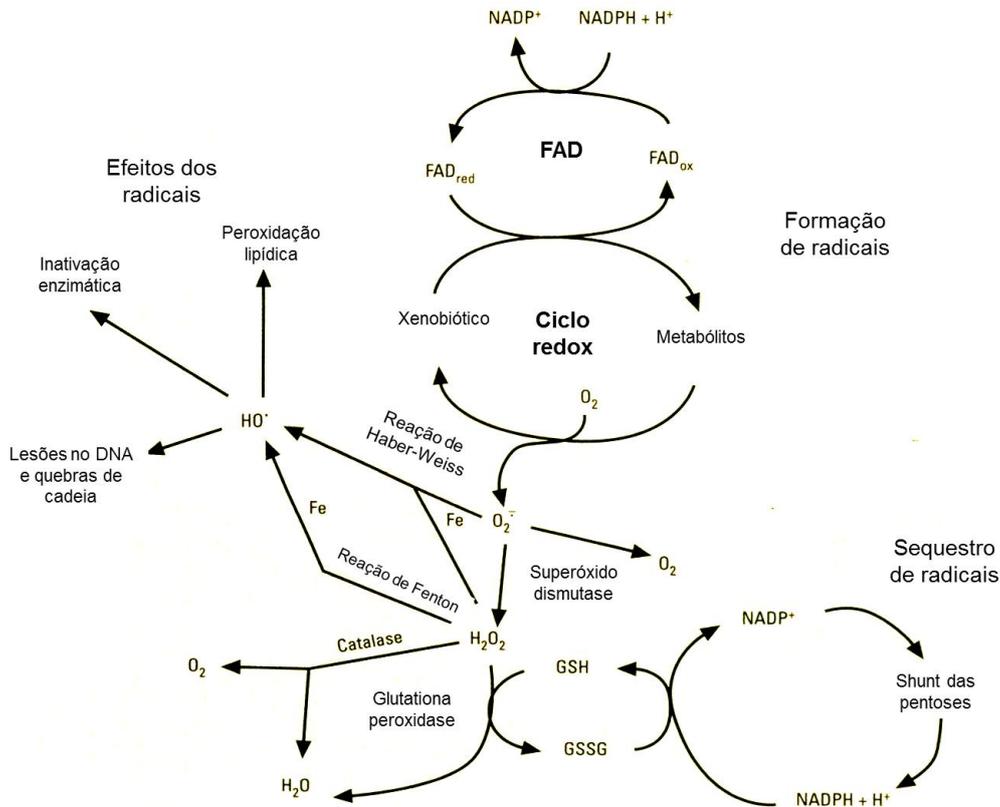
A GSH é uma molécula com muitas funções, protegendo a célula dos pró-oxidantes e exercendo outras funções no metabolismo, na biossíntese, no transporte e na comunicação celular (DI GIULIO; MEYER, 2008). Essa molécula pode também reduzir diretamente as ERO (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, <sup>•</sup>OH) com o seu grupo tiol (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011). Uma das formas de indução de estresse oxidativo por pesticidas é o decréscimo na concentração de agentes redutores, tais

como a glutathione, cuja metabolização reduz o potencial antioxidante do organismo (LUSHCHAK, 2011).

O ácido ascórbico é um nutriente que atua como antioxidante, desintoxicando os metabólitos de peróxido. Ademais, essa molécula está envolvida em reações de hidroxilação de várias vias metabólicas, tais como a hidroxilação de prolina e lisina na síntese de colágeno, um importante tecido conectivo (FRACALLOSSI et al., 2001). O tocoferol e os carotenoides são obtidos pelos animais aquáticos através da alimentação, ao passo que a glutathione, o ácido ascórbico e outras moléculas de alta massa são produzidos pelo próprio organismo. A produção desses antioxidantes é sujeita à regulação ativa, sendo produzidas de acordo com as necessidades do animal (LUSHCHAK, 2011). Quando as defesas antioxidantes enzimáticas estão comprometidas, defesas secundárias como o ácido ascórbico e os tióis são ativados para evitar reações de auto-oxidação (SAYEED et al., 2003; SINHORIN et al., 2014).

A Figura 13 representa, de forma esquemática, o ciclo redox.

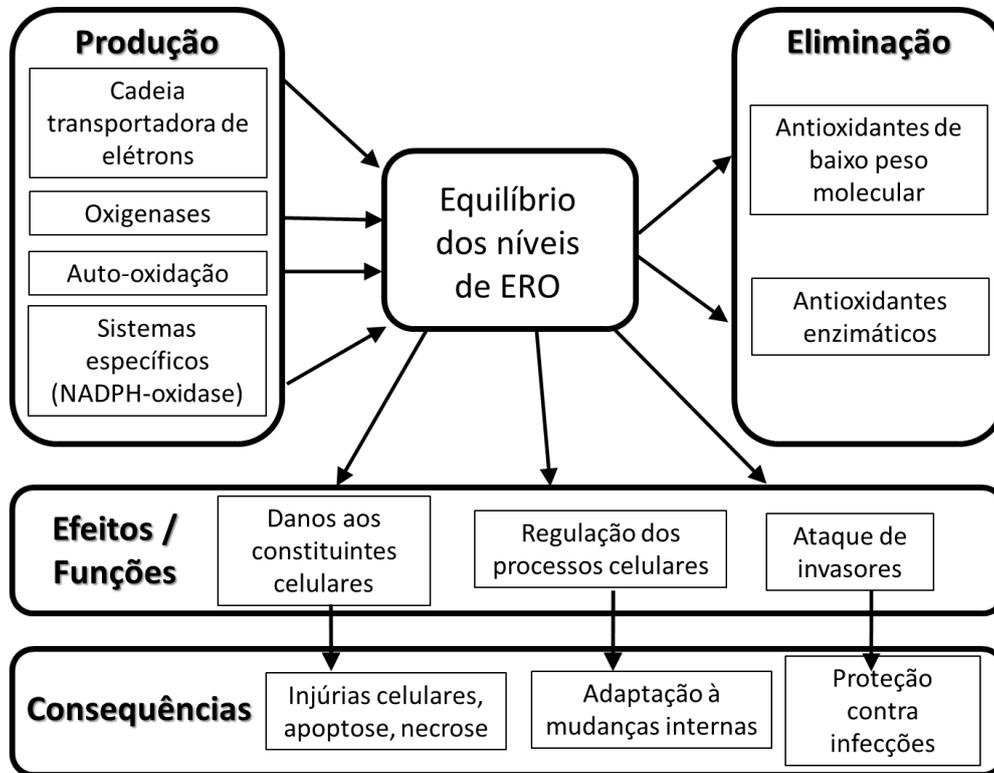
**Figura 13.** Ciclo redox, representando a formação de radicais, as defesas antioxidantes e seus efeitos.



Fonte: adaptado e traduzido de Kelly et al., 1998.

O estresse oxidativo pode ser definido como sendo um aumento na concentração das ERO de forma transitória ou crônica, o que altera o metabolismo celular e sua regulação, podendo danificar os componentes celulares (LUSHCHAK, 2011). O aumento de danos oxidativos pode não apenas causar mais estresse oxidativo, como também provocar a incapacidade em reparar ou substituir as biomoléculas danificadas. Igualmente, o estresse oxidativo pode ser fruto de uma diminuição nos níveis de defesas antioxidantes, esgotamento dos antioxidantes adquiridos através da alimentação, além do supracitado aumento das ERO (HALLIWELL, 2006). A Figura 14 representa os efeitos biológicos promovidos pelo desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de ERO.

**Figura 14.** Equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO e os potenciais efeitos biológicos. A estabilidade das ERO é fornecida pelo equilíbrio entre a geração dessas espécies e sua eliminação. Entretanto, sob determinadas condições, as ERO escapam das defesas antioxidantes, afetando o organismo.



Fonte: adaptado e traduzido de Lushchak (2011).

Os xenobióticos podem induzir o estresse oxidativo através de diversos mecanismos, tais como: i) entrando nos ciclos redox e aceitando/doando elétrons aos constituintes celulares, aumentando assim as ERO; ii) necessitando do envolvimento de redutores, como a glutatona, para sua metabolização, o que pode levar ao esgotamento dessas defesas; iii) inativando enzimas antioxidantes ou enzimas associadas, diminuindo o potencial antioxidante; iv) interferindo nos processos de fornecimento de energia, o que pode diminuir o fornecimento de energia para o metabolismo de desintoxicação; v) modificando processos essenciais como a transcrição e tradução, desequilibrando os níveis de ERO (KELLY et al, 1998; LUSHCHAK, 2011).

Relatos da literatura mostram que a exposição de peixes a inseticidas piretroides pode levar estes organismos ao estresse oxidativo (VARANKA et al., 2002; SAYEED et al., 2003; PARVEZ; RAISUDDIN, 2005; PINER; ÜNER, 2012; MORAES, 2013a). O peixe *Carassius auratus gibelio* exposto a  $2 \mu\text{gL}^{-1}$  de deltametrina apresenta aumento da peroxidação lipídica (LPO) e da glutatona reduzida (GSH) hepáticas; aumento na atividade da glutatona peroxidase (GPx), da glutatona transferase (GST) e da glutatona redutase (GR), e inibição da atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). No intestino, há aumento da LPO e esgotamento da GSH; aumento da atividade da CAT, da GST e da GR (DINU et al., 2010). A exposição ao fenvalerato provocou aumento da SOD e CAT hepáticas e branquiais em *L. rohita* (MOHAPATRA et al., 2012). Larvas de *C. carpio* expostas à gama-cialotrina apresentaram aumento da atividade da GST e diminuição na atividade da GPx (RICHTEROVÁ et al., 2014). Estudos que compreendam a atividade antioxidante em peixes podem abrir uma nova e ampla linha de trabalhos que possibilitem melhor entendimento da fisiologia dos peixes, podendo trazer benefícios em vários aspectos da criação comercial destes animais (MARTINEZ-ÁLVAREZ et al., 2005).

### **Biomarcadores histopatológicos**

Os xenobióticos no ambiente aquático podem induzir modificações patológicas em peixes. Como um indicador de exposição a contaminantes, a histologia representa um instrumento útil para a avaliação do grau de poluição (CENGIZ, 2006). Segundo Johnson e colaboradores (1993), a análise histológica é um método rápido para se determinar os efeitos dos agentes químicos em tecidos e órgãos, pois ocorrem alterações na morfologia em resposta ao estresse sub-letal ou crônico. Há um grande número de estudos de avaliações de risco ambientais que utilizam os biomarcadores histopatológicos, todavia, a ausência de dados numéricos dificulta o estabelecimento de relações de causa e efeito entre a patologia observada e os contaminantes. Dessa forma, tais estudos têm focado em índices histopatológicos que forneçam dados numéricos baseados em abordagens semi-quantitativas (COSTA et al., 2009).

Em termos gerais, os resultados obtidos na avaliação de níveis de organização biológica mais baixos, como as respostas bioquímicas e moleculares, são mais específicos, sensíveis e apresentam alta reprodutibilidade. No entanto, estes são mais difíceis de serem correlacionados a efeitos ecológicos. Por outro lado, as respostas obtidas em níveis mais altos de organização, como por exemplo em populações e comunidades, indicam diretamente o status do ecossistema, sendo relevantes em avaliações ambientais; entretanto, essas respostas são de difícil acesso, principalmente considerando-se as avaliações *in loco*. Dessa forma, as avaliações histopatológicas, as quais são relativamente fáceis de serem determinadas, atuam como um vínculo entre o *fitness* individual e os efeitos ecológicos, permitindo a extrapolação das respostas individuais à populações (AU, 2004; SCHLENK et al., 2008). Assim como outros biomarcadores, os histopatológicos apresentam desvantagens, pois outros fatores podem afetar a morfologia dos órgãos dos peixes, que não a exposição a xenobióticos; dentre os quais destacam-se: a idade, o status nutricional, fatores ambientais, variações sazonais, ciclos reprodutivos e estados estruturais dos órgãos que podem denotar normalidade, porém são confundidos com estados patológicos (por exemplo, o alto índice de renovação celular hepático) (SCHLENK et al., 2008).

A eleição de tecidos para a avaliação de efeitos histopatológicos deve considerar as rotas de exposição ao xenobiótico, assim como o papel do tecido na metabolização do mesmo. Os sintomas histopatológicos descritos em peixes expostos a contaminantes podem afetar o organismo através de perturbações na homeostase e do funcionamento adequado de importantes processos biológicos, como a desintoxicação, osmoregulação, respiração, entre outros (AU, 2004).

O fígado é o principal órgão de biotransformação de xenobióticos e provavelmente de excreção de metais pesados, além de atuar na digestão, no armazenamento de energia e no metabolismo de hormônios sexuais (HINTON et al., 2001). De acordo com Hinton e Laurén (1990), este órgão é essencial para o

metabolismo e a excreção de substância tóxicas. Dessa forma, a avaliação histopatológica de fígado em peixes expostos a poluentes, fornece subsídios para a elucidação da toxicidade que prejudica tais funções. Os piretroides afetam a morfologia do fígado de peixes, como demonstrado em *C. mrigala* expostos à LCH (VELMURUGAN et al., 2007); *C. gariepinus* expostos à cipermetrina (VELMURUGAN et al., 2009); *O. niloticus* e *Sparus aurata* expostos à deltametrina (YILDIRIM et al., 2006; KAN et al., 2012; GUARDIOLA et al., 2014).

Em peixes, o rim desempenha funções importantes relacionadas ao balanço hídrico e à manutenção de um ambiente interno estável, atuando assim nos processos de excreção de resíduos nitrogenados e de osmoregulação (CENGIZ, 2006). Os piretroides podem prejudicar esses processos, sendo possível acessar esses dados através de estudos histopatológicos, como evidenciado em *C. carpio* expostos à deltametrina (CENGIZ, 2006); *C. mrigala* expostos à LCH (VELMURUGAN et al., 2007); *O. niloticus* expostos à cipermetrina (KORKMAZ et al., 2009).

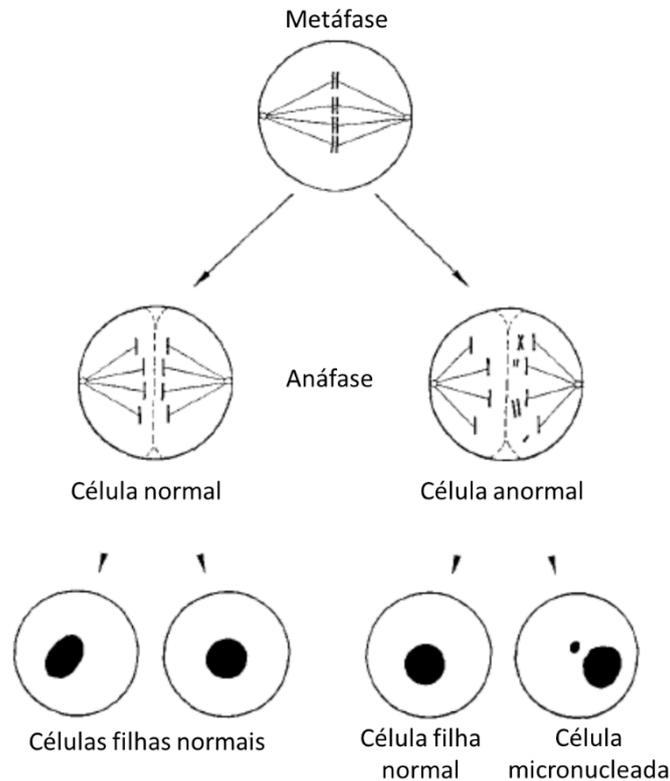
As brânquias dos peixes são órgãos multifuncionais responsáveis pela respiração, osmoregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de produtos nitrogenados. Este órgão é bastante sensível a qualidade da água e poluentes, visto que os filamentos branquiais e as lamelas fornecem uma grande superfície de contato direto e contínuo com a água (AU, 2004). Dada a alta lipofilicidade dos compostos piretroides, quando presentes na água, estes inseticidas podem se aderir à superfície branquial, promovendo injúrias histopatológicas, como observado em *Lebistes reticulatus* expostos à zeta-cipermetrina (ÇALISKAN et al., 2003); em *Catla catla* expostos à alfa-cipermetrina (MUTHUVIVEGANANDAVEL et al., 2013); em *Pangasius hypophthalmus* expostos à deltametrina (HEDAYATI; TARKHANI, 2014); em *C. auratus* exposto à LCH (LI et al., 2014).

### ***Biomarcadores de genotoxicidade***

As modificações no material genético de um organismo têm alto impacto em populações. As consequências das alterações no DNA afetam todos os níveis de organização biológica, desde o molecular até o nível de comunidades. Quando ocorrem modificações na estrutura do DNA, tanto a sobrevivência como o sucesso reprodutivo de determinada espécie podem ser afetados (SCHLENK et al., 2008). Essas consequências evidenciam a importância de avaliações acerca dos efeitos genotóxicos de poluentes em animais. Atualmente, várias metodologias estão disponíveis para a avaliação desses efeitos; danos estruturais em níveis moleculares e celulares podem ser avaliados através da formação de adutos de DNA; do desenovelamento alcalino; do teste de cometa; avaliação de micronúcleos, citometria de fluxo e avaliação específica de mutações pontuais. Já os efeitos genéticos em populações e organismos podem ser acessados através da avaliação de aloenzimas, do DNA mitocondrial, de técnicas de amplificação de polimorfismos de DNA amplificados randomicamente (RAPD), microssatélites e impressões digitais de DNA (SCHLENK, 2008).

Dentre as técnicas disponíveis, a avaliação de micronúcleos (MN) tem sido usada há algum tempo em mamíferos, mas mostrou-se adequada para testes em peixes. Dentre as vantagens desse método, destaca-se a aplicação do mesmo em eritrócitos, os quais são nucleados nesse grupo de animais, representando assim uma diminuição no número de animais experimentais, além de poder ser utilizada *in situ*. Essa foi a técnica utilizada neste estudo e será o foco principal dessa revisão.

Os micronúcleos são formados quando um cromossomo inteiro ou um fragmento não migram juntamente com o núcleo formado durante a mitose. A perda do cromossomo inteiro ocorre devido à um evento aneugênico relacionado ao fuso, ao passo que a perda do fragmento ocorre graças à uma quebra cromossômica (UDROIU, 2006). A Figura 15 mostra os eventos envolvidos na formação de micronúcleos.

**Figura 6.** Mecanismo de formação de micronúcleo em células mononucleadas.

Fonte: adaptado e traduzido de Al-Sabti; Metcalfe, 1995.

Os micronúcleos aparecem separados do núcleo principal, e são menores. Como o MN são dependentes do ciclo celular, esse fator deve ser considerado ao avaliar a formação dessas aberrações genéticas (AL-SABTI; METCALFE, 1995). De acordo com a literatura, o pico de formação de MN em eritrócitos de peixes ocorre entre 1 a 5 dias após a exposição, entretanto, na maioria das espécies, esse evento ocorre após 2 ou 3 dias (UDROIU, 2006). Para Russo e colaboradores (2004), o teste do MN é bastante útil para acessar danos citogenéticos a curto prazo. Além da avaliação de MN, alterações nucleares também são avaliadas, e as formas dessas alterações foram descritas por Carrasco (1990), sendo elas: núcleo segmentado; núcleo lobulado; núcleo com constrição ou em “forma de rim” e binucleado.

Diversos pesticidas causam alterações nucleares em peixes, inclusive piretroides. Danos no DNA provenientes dessa interação podem ser relacionados com

o aumento de ERO e consequente estresse oxidativo; como ressaltado anteriormente, as ERO que não são metabolizadas e/ou eliminadas pelas defesas antioxidantes, apresentam o potencial de danificar as células. A correlação entre estresse oxidativo e formação de MN foi observada em *O. niloticus* expostos à deltametrina (KAN et al., 2012). Outras espécies expostas a piretroides também apresentaram tais aberrações genéticas, como *Cheirodon interruptus interruptus*, *Garra rufa*, *Mystus gulio* e *Gambusia affinis* expostos à LCH (CAMPANA et al., 1999; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; VELMURUGAN et al., 2006; MURANLI; GÜNER, 2011) e *C. punctata* expostos à deltametrina (ANSARI et al., 2009).

## 2.7. Matrinxã (*Brycon amazonicus*)

Os peixes podem ser encontrados em praticamente todo o ambiente aquático e desempenham um papel essencial nas cadeias alimentares, dada sua função de transporte de energia dos níveis tróficos mais baixos até os mais altos. Dessa forma, o entendimento das respostas de peixes à xenobióticos tem alta relevância ecológica (OOST et al., 2003). Ademais, os peixes representam uma das maiores fontes de proteína alimentar em todo o mundo, o que evidencia sua importância econômica.

A espécie escolhida para este estudo foi o matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX; AGASSIZ, 1829) (Figura 16). Esse peixe ocupa a seguinte posição taxonômica:

CLASSE – Osteichthyes

SUBCLASSE – Actinopterygii

INFRACLASSE – Teleostei

SUPERORDEM – Osthariophysi

ORDEM – Characiformes

FAMÍLIA – Characidae

GÊNERO – *Brycon*

ESPÉCIE – *Brycon amazonicus*

**Figura 16.** Exemplar de matrinxã (*Brycon amazonicus*).



Fonte: Moraes (2013a).

O matrinxã (*Brycon amazonicus*) é um peixe Neotropical originário da bacia amazônica e amplamente cultivado no Brasil. Segundo Zaniboni-Filho e colaboradores (2006), o matrinxã tem ótima aceitabilidade no mercado, devido ao agradável sabor da carne, crescimento inicial rápido e fácil manuseio.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2014), em 2012, o Brasil foi o segundo maior produtor de pescado do continente americano, contribuindo com 22,2% da produção. De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura, em 2011 foram produzidas mais de 5.700 toneladas de matrinxã no Brasil (BRASIL, 2011). Somando-se todas as espécies, neste mesmo período, o Brasil produziu aproximadamente 545.000 toneladas de pescado, sendo o estado de São Paulo o quarto maior produtor de pescado do país.

Esses dados evidenciam a importância e o crescimento da aquicultura brasileira e, somados ao fato de que o Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, mostram a relevância de estudos que associem pesticidas amplamente utilizados e espécies aquáticas cultivadas, no que tange aos efeitos provocados pela exposição de organismos não-alvo a xenobióticos.

---

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

---

Os piretroides pertencem a uma relevante classe de inseticidas devido à sua ampla utilização, o que os torna excelentes candidatos a estudos. A exposição aos piretroides exibe o potencial de alterar, de forma adversa, os peixes de água doce, o que produz importantes consequências para as populações desses animais e seu sucesso. Essa exposição, em especial quando fruto de lixiviação de áreas agrícolas ou tratamento de ectoparasitos, é intermitente: os animais são expostos a pulsos de contaminantes, o que é seguido por períodos sem contato com o xenobiótico. Dessa forma, a avaliação de biomarcadores após um período de recuperação à exposição é relevante ao entendimento da dinâmica de toxicidade induzida pelos piretroides, aumentando o mimetismo dos efeitos obtidos em ambiente natural.

A maioria dos estudos sobre a toxicidade de piretroides em peixes de água doce foi desenvolvida na Europa e América do Norte; entretanto, esses resultados podem ser pouco úteis na avaliação desses efeitos nos trópicos, visto que a temperatura e as condições físico-químicas da água têm grande influência em sua toxicidade. Sendo a lambda-cialotrina o piretroide tipo II com maior número de registros comerciais no Brasil, e sendo o matrinxã (*B. amazonicus*) uma das espécies mais representativas da aquicultura nacional, o estudo das interações entre essa espécie e a lambda-cialotrina assume particular importância. Assim, este estudo teve por fim avaliar os efeitos fisiológicos, bioquímicos e histológicos em *B. amazonicus* após 96 horas de exposição à LCH e a recuperação após 7 dias. Para isso, adotou-se as estratégias que se seguem avaliadas através de alguns marcadores biológicos.

- I. Estimativa da CL50;96h de LCH para o *B. amazonicus*, e avaliação dos sinais de intoxicação;
- II. Avaliação dos efeitos de 10% da CL50;96h (exposição sub-letal) de LCH sobre a osmoregulação e os parâmetros hematológicos de *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição e 7 dias de recuperação em água livre do xenobiótico;

- III. Avaliação dos efeitos de 10% da CL50;96h (exposição sub-letal) de LCH sobre a atividade da acetilcolinesterase cerebral de *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição e 7 dias de recuperação em água livre do xenobiótico;
- IV. Avaliação dos efeitos de 10% da CL50;96h (exposição sub-letal) de LCH sobre o sistema antioxidante hepático, renal e branquial de *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição e 7 dias de recuperação em água livre do xenobiótico;
- V. Avaliação dos efeitos de 10% da CL50;96h (exposição sub-letal) de LCH sobre a morfologia de fígado, rim e brânquias de *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição e 7 dias de recuperação em água livre do xenobiótico;
- VI. Avaliação dos efeitos genotóxicos de 10% da CL50;96h (exposição sub-letal) de LCH em *B. amazonicus*, após 96 horas de exposição e 7 dias de recuperação em água livre do xenobiótico.

Este estudo assentou-se na hipótese de que biomarcadores de contaminação ambiental são responsivos à contaminação por piretróides; sendo que a adaptação bioquímico-fisiológica do matrinxã é revelada em decorrência da exposição sub-letal. De acordo com os resultados observados e discutidos (seções 5 e 6), essa hipótese foi aceita na maior parte das avaliações.

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

Os testes de estimativa da CL<sub>50</sub>;96h, para exposição sub-letal (10% da CL<sub>50</sub>;96h) e de recuperação foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica Adaptativa da Universidade Federal de São Carlos. O xenobiótico utilizado foi a  $\lambda$ -cialotrina (mistura de 1:1 de (Z)-(1R,3R)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de (S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzila e (Z) - (1S,3RS) - 3 - (2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil) - 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato de  $\alpha$ -alfa-ciano-3-fenoxibenzila), na formulação Trinca Caps® (DVA), contendo 250 gramas de ingrediente ativo por litro da formulação comercial.

### 4.1. Desenho Experimental

Exemplares de matrinxã provenientes da Piscicultura Polettini – Mogi Mirim-SP, com peso de  $\pm$  30 gramas, foram aclimatados por 15 dias em tanques de 2500L com aeração, renovação de água constante e temperatura controlada (27°C), e alimentados com ração comercial até a saciedade. Após este período, os peixes foram transferidos para tanques de 250L para determinação da toxicidade aguda (CL 50;96h) e dos testes de exposição sub-letal e recuperação.

### 4.2. Determinação da toxicidade aguda CL<sub>50</sub>;96h da LCH para o matrinxã

Foi realizado um teste preliminar de toxicidade aguda para se determinar o intervalo de concentração de LCH capaz de causar mortalidade de 0 a 100%. Este intervalo foi utilizado no teste definitivo. A alimentação dos animais foi suspensa 24 horas antes do início dos testes e os peixes permaneceram assim até o final do experimento.

No teste definitivo, foram utilizados cinco animais de  $17,3 \pm 1,5$  cm e  $40,2 \pm 2,9$  g, por repetição, respeitando-se as recomendações do IBAMA (1987) para densidade máxima de 1.0g de peixe por litro. Os animais foram expostos às seguintes

concentrações de LCH: 5, 6, 7, 8, 9 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os testes foram realizados com três réplicas e um controle (ABNT, 2006). O teste definitivo foi conduzido em sistema estático, ou seja, sem substituição, sifonagem de água ou alimentação durante o período de exposição (OECD, 1992). Os parâmetros de qualidade de água permaneceram constantes durante o período experimental. A avaliação da mortalidade e a retirada dos animais mortos era realizada diariamente.

Os valores de CL<sub>50;96h</sub> foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

#### **4.3. Exposição sub-letal à LCH e recuperação**

Após a determinação da CL<sub>50;96h</sub>, os peixes foram expostos a 0,65  $\mu\text{g L}^{-1}$  de LCH (10% do valor obtido no referido teste). Neste experimento, 96 peixes de 82,68  $\pm$  18,67 g foram divididos igualmente em 12 tanques de 250L. Seis tanques foram utilizados como controle (sem adição do xenobiótico); três tanques como controle da exposição sub-letal e três tanques como controle da recuperação. Os seis tanques restantes foram utilizados para exposição sub-letal de 96 horas e recuperação de 7 dias, sendo três tanques para exposição sub-letal e três tanques para a recuperação em água livre do xenobiótico. Tal como na determinação da toxicidade aguda, a alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do teste e os animais permaneceram assim até o final do período de recuperação. Durante o período de exposição (em sistema estático), os tanques foram mantidos com aeração constante e temperatura controlada (27°C). Os parâmetros de qualidade de água do período de exposição estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Qualidade da água no experimento de exposição sub-letal (20 % da CL50;96h) de LCH, por 96 horas. Média e desvio padrão para o total de coletas de água (n=4).

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>Exposição</b>
Temperatura (°C)	27,32±0,8	26,78±0,4
Oxigênio (mg L <sup>-1</sup> )	5,4±0,4	5,6±0,6
Amônia (µmol L <sup>-1</sup> )	0,38±0,1	0,42±0,1
Dureza (mg de CaCO <sub>3</sub> )	19,04±0,9	19,04±0,7
Alcalinidade (mg L <sup>-1</sup> de HCO <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	22,1±0,6	24,3±0,5
pH	7,3±0,2	7,5±0,3

Após o período de exposição sub-letal, foram coletadas amostras de sangue com seringas heparinizadas. O sangue foi dividido em alíquotas e centrifugado a 15.000 x g por 3 minutos para obtenção de plasma. Após a punção sangüínea, oito animais foram retirados de cada tanque e anestesiados com eugenol (INOUE et al., 2003). Após a anestesia, os animais foram mortos, pesados, e a coleta de tecidos (brânquias, cérebro, fígado e rim) foi realizada para posteriores análises bioquímica e histológica. Os fígados dos peixes foram secos em papel filtro e pesados para estimativa do índice hepatossomático. Os tecidos para as análises bioquímicas foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a - 80°C. Os tecidos para a análise histológica foram imediatamente fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,2M. Para a determinação da atividade de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase branquial, dois arcos branquiais foram lavados em solução salina e congelados (- 80°C) em tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4).

Após o período de exposição sub-letal (96 horas) os tanques utilizados para recuperação tiveram a água renovada, permanecendo assim livres do xenobiótico. Durante os 7 dias de recuperação, a água dos tanques foi renovada por fluxo contínuo e a temperatura permaneceu constante (27 °C). Os parâmetros de qualidade de água permaneceram constantes durante o período de recuperação. Ao término do período de recuperação, os procedimentos de coleta descritos acima foram repetidos.

#### 4.4. Parâmetros de qualidade de água

A temperatura e o oxigênio dissolvido foram determinados nos tanques por sonda (Dissolved Oxygen YSI 55), assim como o pH (pHmetro Orion 710). A dureza da água foi determinada segundo APHA (1980); a alcalinidade segundo Goldstein e Clymo (1969) e a amônia pelo método modificado de Gentzkow e Masen (1942).

#### 4.5. Índice hepatossomático (IHS)

O cálculo do índice hepatossomático foi feito de acordo com:

$$\text{IHS} = (\text{Pf} / \text{Pt}) \times 100$$

onde Pf é o peso do fígado e Pt é a peso total do animal.

#### 4.6. Parâmetros hematológicos

##### 4.6.1. Hematócrito

O hematócrito foi determinado com micro-capilares vedados com massa de modelar após o preenchimento e centrifugados a 1000 rpm por 3 minutos. Os valores de microhematócrito, expressos em porcentagem, foram obtidos por comparação contra um padrão.

##### 4.6.2. Hemoglobina total

A hemoglobina total foi determinada segundo Drabkin (1948). Para tanto, em 10 µL de sangue eram adicionados 2 mL de solução de Drabkin (KCN, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. A leitura era realizada em 540 nm, contra solução de Drabkin. Para determinação dos valores de hemoglobina total foi utilizada a seguinte expressão:

$$\text{Hb total (gHb/dL)} = \text{densidade óptica} \times 1,6114 / 11 \times \text{diluição}$$

##### 4.6.3. Contagem de eritrócitos (RBC)

Nas contagem de eritrócitos foram diluídos 10 µL de sangue em 2 mL de solução de citrato-formol e então transferido volume adequado para a câmara de

Neubauer. Os eritrócitos foram contados em 5 grupos de quadrados, que são subdivididos em 16 quadrados menores, totalizando assim 80 quadrados menores. Os valores de contagem foram obtidos através da soma dos 5 quadrados maiores (0,1 mm<sup>3</sup>) e convertidos para 10<sup>6</sup> células mm<sup>-3</sup>, considerando-se a diluição (LIMA, 1969).

#### **4.6.4. Volume corpuscular médio (VCM)**

O cálculo do volume corpuscular médio foi feito utilizando-se a seguinte expressão (WINTROBE, 1934):

$$\text{VCM } (\mu\text{mm}^3) = [\text{hematócrito } (\%)/ \text{RBC (milhões/mm}^3)] \times 10$$

#### **4.6.5. Hemoglobina corpuscular média (HCM)**

O cálculo da hemoglobina corpuscular média foi feito com a seguinte expressão (WINTROBE, 1934):

$$\text{HCM (pg/célula)} = [\text{Hb total (g\%)/RBC (milhões/mm}^3)] \times 10$$

#### **4.6.6. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)**

No cálculo da concentração de hemoglobina corpuscular média foi utilizada a seguinte expressão (WINTROBE, 1934):

$$\text{CHCM } (\%) = [\text{Hb total (g\%)/ Hematócrito } (\%)] \times 10$$

#### **4.7. Metahemoglobina (MHb)**

A porcentagem de MHb foi determinada segundo Matsuoka (1997). Uma alíquota de 6 µl de sangue foi homogeneizada em 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) e todo o conteúdo foi centrifugado a 500 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi utilizado na determinação da formação de MHb. Para tal, foram realizadas quatro leituras a 563 nm, tal como segue:

- 1) 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 (D<sub>2</sub>). As leituras D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> foram feitas contra um branco de água.
- 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. 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>.

O cálculo da porcentagem de MHb obedeceu a seguinte expressão:

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

#### 4.8. Íons plasmáticos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>)

Na quantificação de íons plasmáticos utilizou-se 100 µl de amostra de plasma diluídos em 1 mL de água destilada. Os íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foram determinados por fotometria de chama (Digimed<sup>®</sup>), contra um padrão com 140 mEq de Na<sup>+</sup> e 5 mEq de K<sup>+</sup>. Os resultados finais estão apresentados em mEq de íon.

Para quantificar Cl<sup>-</sup>, foram utilizados 100 µl da diluição (1:100) de plasma em água destilada. A metodologia empregada foi adaptada de APHA (1980) e o ensaio consistiu na reação da amostra de plasma diluído com tiocianeto de mercúrio 0,9% diluído em etanol (PA) e nitrato de ferro monohidratado 6% diluído em ácido nítrico 0,4 M, em uma proporção de 3 partes da primeira solução para 10 partes da segunda solução. A leitura óptica foi feita em 480nm, contra um branco de NaCl.

#### 4.9. Proteína plasmática

O teor de proteína plasmática foi determinado em 100 µl da diluição de plasma em água destilada (1:100) adicionados do reagente de Bradford (KRUGER, 1994) em

microplaca. Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro, a leitura óptica foi realizada a 620 nm contra um padrão de albumina bovina sérica.

#### **4.10. Antioxidantes não-enzimáticos**

##### ***Ácido ascórbico***

A concentração de ácido ascórbico foi determinada em cérebro e fígado, em 524 nm (CARR et al., 1983). Alíquotas dos tecidos foram homogeneizadas em TCA 5% (ácido tricloroacético) na razão de 1:50, com homogeneizador rotativo (Turrax® T10, Ika) na velocidade intermediária. Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados por 3 minutos a  $13\,400 \times g$  e os sobrenadantes, utilizados na quantificação. A mistura de reação consistiu de: 250  $\mu\text{L}$  de água destilada, 400  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 25  $\mu\text{L}$  de 2,6-diclorofenolindofenol 0,2 %. Após reagir por 1 hora à temperatura ambiente, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de reagente de tiouréia 0,2 % em ácido metafosfórico 5 % e 250  $\mu\text{L}$  de dinitrofenilhidrazina 0,2 % em ácido sulfúrico 12 M. Esta mistura foi incubada a 60 °C por 3 horas. Após este período, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 18 M resfriado; as amostras foram centrifugadas a  $500 \times g$  por 10 minutos. Os tubos foram resfriados em gelo e a leitura óptica realizada contra um padrão de 100 nmol de ácido ascórbico. A concentração de ácido ascórbico foi expressa em  $\mu\text{mol}$  por grama de tecido.

##### ***Glutathiona reduzida (GSH)***

A concentração de GSH foi determinada em fígado, a 421 nm (BEUTLER, 1984). O método utilizado baseia-se na reação entre GSH e ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB), com formação de ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico (TNB), um produto de cor amarelada. Porções de tecidos foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7, em banho de gelo, na razão de 1:20, em homogeneizador rotativo (Turrax® T10, Ika) na velocidade intermediária. Em seguida, os homogeneizados foram

centrifugados a  $13\,400 \times g$  por 3 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de GSH. Em  $500\ \mu\text{L}$  de sobrenadante foram adicionados  $750\ \mu\text{L}$  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 foi centrifugada a  $13\,400 \times g$  por 3 min e dela foram retirados outros  $500\ \mu\text{L}$  do sobrenadante, nos quais foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8 e  $250\ \mu\text{L}$  de DTNB 2,5 mM. Esta mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foi feita a leitura óptica da formação do ânion tiolato em 412 nm, contra um padrão de 100 nmol de GSH.

#### **4.11. Atividades enzimáticas**

##### **4.11.1. Acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade de AChE cerebral foi determinada de acordo com Ellman e colaboradores (1961), modificado. Uma porção de cérebro foi homogeneizada em tampão glicerina/fosfato 20mM pH 7,0, na proporção 1:2, em homogeneizador rotativo (Turrax<sup>®</sup> T10, Ika) em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a  $13\,400 \times g$  por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante (0,3 mg de proteína), utilizado como fonte de enzima. A hidrólise da acetilcolina pela AChE foi determinada cineticamente na presença de DTNB, acompanhando-se a formação de 5-tio-2-nitrobenzoato a 412 nm. A mistura da reação continha: tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico 100 mM pH 7,5; acetiltiocolina 3,75 mM; e DTNB 6,4mM. A atividade da acetilcolinesterase está expressa em unidades (UI) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como a quantidade de enzima necessária à formação de  $1\ \mu\text{mol}$  de 5-tio-2-nitrobenzoato por minuto. O valor do coeficiente de extinção molar do 5-tio-2-nitrobenzoato foi  $16,950\ (\text{mM}\cdot\text{cm})^{-1}$ .

#### 4.11.2. Atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase branquial (NKA)

Para a determinação da atividade da NKA branquial, as brânquias foram lavadas em solução salina no momento da coleta e alguns filamentos branquiais foram separados dos arcos e congelados (- 80°C) em tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4). Os filamentos branquiais foram homogeneizados e centrifugados a 4°C por 5 minutos a 10 000 × g. O sobrenadante (0,7 mg de proteína) foi utilizado para a determinação da atividade da NKA de acordo com Quabius (1997) e adaptado para leitora de microplaca. A leitura óptica foi feita em 620 nm e a atividade da enzima está expressa em μM Pi/mg proteína/h.

#### 4.11.3 Enzimas antioxidantes

As atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) foram ensaiadas segundo Beutler (1984). O homogeneizado celular consistiu de uma alíquota de tecido em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 contendo sacarose 0,25 M na proporção de 1:1. As amostras eram homogeneizadas em banho de gelo, em homogeneizador rotativo (Turrax<sup>®</sup> T10, Ika) na velocidade intermediária, e centrifugadas por 10 minutos a 15 000 × g a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima.

#### ***Superóxido dismutase total (SOD)***

A atividade de SOD foi ensaiada em homogeneizados de fígado e brânquias. O ensaio de SOD consistia na auto-oxidação do pirogalol que é inibido na presença dessa enzima. A determinação de SOD foi feita em cubeta de 3 mL à qual eram adicionados 200 μL de Tris HCl-EDTA 1 M, pH 7,5, e 0,4 mg de proteína do sobrenadante, completando-se o volume com água destilada para 1960 μL. As amostras eram pré-incubadas a 25 °C por 2 minutos. Posteriormente, eram adicionados 40 μL de pirogalol 10 mM em HCl 10 mM. A variação de densidade óptica

era determinada em 420 nm por 2 minutos com intervalo de 15 segundos. A atividade de SOD foi determinada sabendo-se que uma unidade (UI) inibe 50 % da auto-oxidação de pirogalol.

### ***Catalase (CAT)***

A atividade de CAT foi ensaiada em sobrenadante de fígado, brânquias e rim, baseando-se no decaimento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em 230nm. Ao sobrenadante eram adicionados 20 µL de etanol a 95% para impedir a reversão da atividade enzimática. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi 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, feita em 230 nm. Esta primeira leitura foi chamada de DO1. Após esta leitura, eram adicionados à mesma cubeta 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estoque diluída 100 vezes e uma nova leitura óptica era realizada; chamada de DO2. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada subtraindo-se DO1 de DO2 e multiplicando-se o resultado por 141, dado que o  $\epsilon$  da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é 0,071 (mM.cm)<sup>-1</sup> e o volume final na reação era de 2 mL.

$$[H_2O_2] = (DO2 - DO1) \times 141$$

A atividade de catalase foi determinada adicionando-se à uma 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 volume apropriado de sobrenadante (0,2 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 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 GPx foi ensaiada em fígado, brânquias e rim. O ensaio consiste na extinção do NADPH+H<sup>+</sup> pela glutathione redutase (enzima acessória). No ensaio enzimático eram adicionados a uma cubeta de 1mL: 100 µL de Tris-EDTA 1 M pH 8,0;

20  $\mu\text{L}$  GSH 0,1 M; 100  $\mu\text{L}$  de glutationa redutase 10 U/mL; 100  $\mu\text{L}$  de NADPH+H<sup>+</sup> 2 mM; 380  $\mu\text{L}$  de azida sódica 2,6  $\mu\text{M}$ ; 0,1 mg de proteína do sobrenadante e água destilada para completar 970  $\mu\text{L}$ . A mistura de reação era pré-incubada por 2 minutos. Após a pré-incubação, eram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de t-butilhidroperóxido 7 mM. O decréscimo de densidade óptica era determinado contra um branco a 340 nm. O coeficiente de extinção molar do NADPH utilizado no cálculo foi  $\epsilon = 6,20 \text{ (mM.cm)}^{-1}$ . Uma unidade (UI) de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1,0  $\mu\text{mol}$  de NADPH+H<sup>+</sup> por minuto.

### ***Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)***

A G6PDH foi ensaiada em sobrenadante de fígado, brânquias e rim. O ensaio é baseado na redução do NADP<sup>+</sup> a 340 nm. A mistura de reação era consistida de: HCl 0,1 M pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 0,01 M e NADP<sup>+</sup> 0,2 mM em um volume final de 880  $\mu\text{L}$ . A este coquetel eram adicionados 0,1 mg de proteína do sobrenadante e água destilada para um volume final de 950  $\mu\text{L}$ . A reação era iniciada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de glicose-6-fosfato 0,1 M. A redução de NADP<sup>+</sup> era determinada por 2 minutos, com registros a cada 15 segundos. O coeficiente de extinção molar do NAPH utilizado para o cálculo foi  $\epsilon = 6,20 \text{ (mM.cm)}^{-1}$ . Uma unidade de enzima (UI) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0  $\mu\text{mol}$  de NADPH+H<sup>+</sup> por minuto.

### ***Glutationa-S-transferase (GST)***

A atividade de GST foi ensaiada em homogeneizados de fígado, de acordo com Habig e Jakoby (1981), com modificações. As amostras foram homogeneizadas em tampão de homogeneização Tris-HCl (100mM), EDTA (2mM), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (5mM) e PMSF (1mM), pH 7,75, na razão de 1:1, em homogeneizador rotativo (Turrax<sup>®</sup> T10, Ika) na velocidade intermediária. Posteriormente à homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 20 minutos, a 10 000  $\times g$  e os sobrenadantes foram utilizados como fonte de enzima. O ensaio de GST consiste na conjugação de

glutationa reduzida (GSH) com 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST. A determinação da atividade enzimática foi feita em cubeta de 3 mL, à qual eram adicionados 2600 µl de tampão de reação (fosfato de potássio 100mM, pH 7), 150µl de CDNB 25mM em etanol e 0,1 mg de proteína. Após incubação por 1 minuto, foram adicionados 150µl de GSH 25mM. A variação da densidade óptica a 340 nm foi determinada por 2 minutos com registro a cada 15 segundos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi  $\epsilon = 9,6 \text{ (mM.cm)}^{-1}$ .

#### **4.11.3. Proteína nos homogeneizados de tecidos**

O teor de proteína dos homogeneizados tissulares foi determinado com reagente de Bradford (KRUGER, 1994) em microplaca. Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro, a absorbância a 620nm era determinada contra um padrão de albumina sérica bovina.

#### **4.12. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Os aldeídos resultantes da peroxidação de lipídios foram determinados em fígado, rim e brânquias de acordo com Draper e Hadley (1990). As amostras eram homogeneizadas em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 0,5 mL de de hidroxitolueno butilado 0,05% em metanol. O homogeneizado era fervido por 30 min e resfriado à temperatura ambiente. Estes procedimentos possibilitam a liberação de aldeídos possivelmente conjugados a proteínas. O material particulado era então retirado da mistura por centrifugação a  $1000 \times g$  por 10 min. Ao sobrenadante era adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,35% 1:1 (v/v). Essa mistura era mantida em banho fervente por 30 min. Nesta etapa o pH chega a valores próximos a 1,5, favorecendo a reação do TBA com os aldeídos da amostra. A mistura era então resfriada à temperatura ambiente. O complexo TBA-aldeído foi quantificado a 532 nm. A concentração de TBARS presente na amostra foi calculada usando-se uma curva

padrão de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. O resultado está expresso em nmol de TBARS por grama de tecido ( $\text{nmol g}^{-1}$ ).

#### 4.13. Avaliação histológica

A avaliação histológica de secções de fígado, rim e brânquias foram realizadas em amostras de tecido retiradas e imersas em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (0,2M), por 24 horas. Após esse período, as amostras foram imersas em solução de glutaraldeído 0,5% em tampão fosfato. Após a fixação, foi realizada a desidratação em série crescente de álcool (70 a 100 %) e embebição em resina histológica (Merck®). Em seguida, foi realizada microtomia para obtenção de cortes de 3 a 5 $\mu\text{m}$  de espessura. As secções histológicas foram coradas com azul de toluidina e fucsina básica. As análises histopatológicas foram efetuadas de acordo com Cerqueira e Fernandes (2002). Foram analisados 10 campos aleatórios em filamentos distintos para cada amostra, em microscópio óptico (Olympus BX51) com aumento de 40x. As imagens foram fotodocumentadas com câmera de vídeo utilizando-se o software Motic Images Plus 2.0.

As frequências de danos tissulares foram registradas e o Índice de Alteração Histopatológica (IAH) foi calculado. Os danos são classificados em: estágio I, lesões não muito severas que não afetam o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais; estágio II, lesões moderadamente severas que podem afetar o funcionamento do órgão e ser irreversíveis, porém, em geral são pontuais e estágio III, lesões muito severas e normalmente irreversíveis onde o funcionamento do órgão fica muito prejudicado (Tabela 2).

De acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), modificado por Cerqueira e Fernandes (2002), o IAH é o resultado da somatória de pesos dos diferentes estágios.

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

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 tal como descrito na Tabela 3. O sistema de notas para os danos histológicos permite uma comparação objetiva entre os grupos exposto e controle, e entre recuperados e controle da recuperação.

**Tabela 2.** Alterações histopatológicas em fígado, rim e brânquias e respectivos estágios, baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões.

<b>Alterações</b>			
	<b>Estágio I</b>	<b>Estágio II</b>	<b>Estágio III</b>
<b>Fígado</b>	Hipertrofia nuclear / celular	Vacuolização nuclear	
	Atrofia nuclear / celular	Degeneração nuclear / citoplasmática	
	Aumento da frequência do número de vasos	Núcleos picnóticos	
	Deformação do contorno nuclear / celular	Ausência de nucléolo / núcleo	Necrose focal
	Núcleos na periferia da célula	Rompimento celular	Necrose total
	Desarranjo dos cordões hepáticos	Estagnação biliar	
	Presença de melanomacrófagos	Ruptura de vasos	
	Vacuolização citoplasmática	Congestão	
	Grânulos eosinófilos		
	<b>Rim</b>	Hipertrofia celular / nuclear	Rompimento celular
Vacuolização celular		Degeneração granular / hialina	
Dilatação da luz tubular		Oclusão da luz tubular	
Túbulos em regeneração		Degeneração tubular / tecidual	
Dilatação dos capilares		Novos néfrons	
Espessamento do endotélio capilar		Redução do espaço de Bowman	
Aumento do volume glomerular		Aumento do espaço de Bowman	Necrose
		Presença de hemácias no espaço de Bowman	
	Hemorragia		
	Gordura		
<b>Brânquias</b>	Hipertrofia do epitélio lamelar		
	Hiperplasia do epitélio lamelar		
	Congestão vascular		
	Dilatação capilar		
	Descolamento epitelial	Aneurisma lamelar	Necrose focal
	Constricção capilar	Ruptura Epitelial (hemorragia)	Necrose total
	Proliferação de células cloreto		
	Proliferação de células mucosas		
	Fusão das lamelas		
	Edema		

**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

#### 4.14. Teste do micronúcleo (MN) e alterações nucleares eritrocitárias (ANE)

Para avaliar a formação de micronúcleo e alterações nucleares eritrocitárias, foram confeccionadas duas lâminas de esfregaço sanguíneo por animal. Essas lâminas foram secadas por 24 horas em temperatura ambiente, fixadas em metanol absoluto e coradas com May-Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW), de acordo com Tavares-Dias e Moraes (2003). Depois de secadas, foram preparadas para uso permanente. A análise citológica foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX51) sob aumento de 1000X. Foram analisados 3000 eritrócitos por animal, registrando-se as frequências de micronúcleos e as alterações nucleares. Foram realizados testes cegos em ambas as análises. Para ser considerado um micronúcleo, foram observadas as seguintes características (FENECH, 2000): 1) ser morfológicamente semelhante ao núcleo principal; 2) ter diâmetro entre 1/16 e 1/3 do núcleo principal; 3) não ser refringente; 4) não estar ligado ou conectado ao núcleo principal; 5) possuir a mesma intensidade de coloração do núcleo principal, podendo apresentar coloração um pouco mais intensa. A classificação das alterações eritrocíticas nucleares está baseada em Carrasco (1990): 1) núcleo segmentado; 2) núcleo lobulado; 3) núcleo com constrição ou em “forma de rim” e 4) binucleado.

#### 4.15. Análise dos resultados

Os dados bioquímicos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre médias foram feitas por teste paramétrico

ou não-paramétrico, com intervalo de confiança de 95% ( $P < 0,05$ ) para os grupos controle *versus* exposição sub-letal e controle *versus* recuperação de sete dias. As variáveis estão expressas em média  $\pm$  desvio padrão ( $n=12$ ). As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism, versão 5.

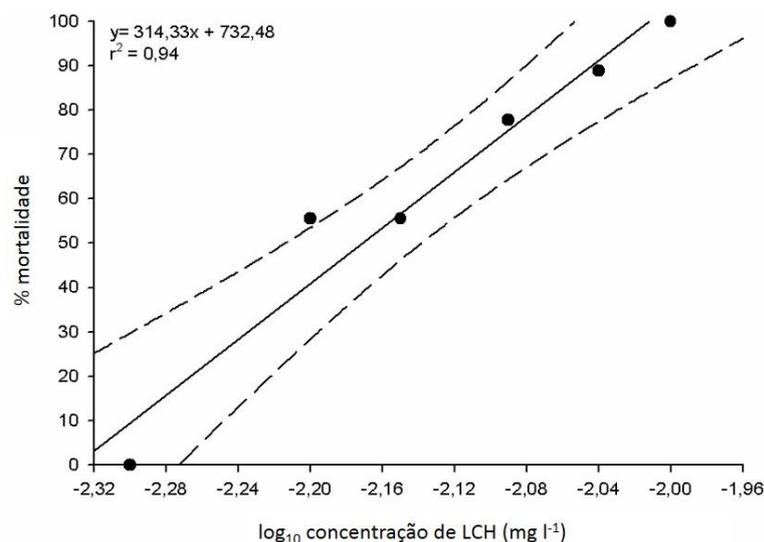
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Estimativa da CL50;96h e sinais de intoxicação

A CL50;96h estimada em juvenis de matrinxã foi  $6,5 \mu\text{g L}^{-1}$  de LCH, com limites entre  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  a  $7 \mu\text{g L}^{-1}$ . Em testes de toxicidade há uma concentração abaixo da qual não se observam efeitos e outra onde há mortalidade de todos ou da maioria dos organismos (BURATINI; BERTOLETTI, 2006). Entre esses extremos a curva que representa esse fenômeno é uma sigmoide. Para linearização dessa curva, os dados devem ser transformados, as concentrações transformadas para escala logarítmica e as porcentagens de efeito transformadas em probitos, tal como apresentado no gráfico abaixo (Figura 17).

Após 96 horas de exposição não houve mortalidade no controle. Na concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  não houve mortalidade; em 6 e  $7 \mu\text{g L}^{-1}$  houve 55,55%; em  $8 \mu\text{g L}^{-1}$ , 77,77%; em  $9 \mu\text{g L}^{-1}$ , 88,88%; e em  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , 100%.

**Figura 7.** CL50;96h de LCH para *Brycon amazonicus*.



A linha cheia representa a linha de regressão e as linhas tracejadas representam o intervalo de confiança (95%).

Imediatamente após a adição do xenobiótico observou-se nos animais expostos um aumento dos movimentos operculares, perda de equilíbrio e natação

errática. Essas alterações permaneceram por mais tempo nas concentrações mais altas. Os animais do grupo controle não exibiram alterações comportamentais.

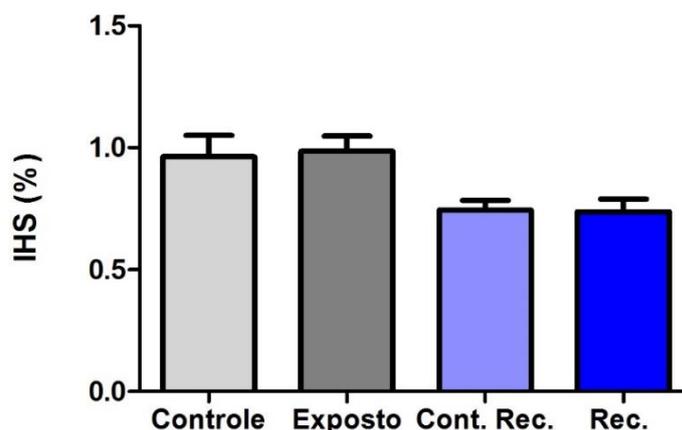
## 5.2. Exposição sub-letal e recuperação

Em função da estimativa da CL50;96h, durante a exposição sub-letal os peixes foram expostos a uma concentração de  $0,65 \mu\text{g L}^{-1}$  (10% da CL50;96h) de LCH.

### 5.2.1. Índice hepatossomático

O índice hepatossomático não diferiu tanto após o período de exposição quanto após o período de recuperação (Figura 18).

**Figura 8.** Índice hepatossomático de matrinxãs expostos à LCH e recuperados.



(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n=12$ ).

### 5.2.2. Parâmetros hematológicos e balanço iônico

Após o período de exposição sub-letal, os peixes expostos apresentaram aumento no hematócrito (10%), hemoglobina total (31%), contagem das células vermelhas (18%), hemoglobina corpuscular média (26%) e concentração de hemoglobina corpuscular média (17%). Após os 7 dias de recuperação, apenas o hematócrito e a hemoglobina total aumentaram 9,5% e 24%, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos e índices hematimétricos de peixes expostos à LCH e de peixes recuperados.

Parâmetro	Controle	Exposição	Controle Recuperação	Recuperação
<b>Ht</b>	24,47±2,6	26,52±2,6*	25,43±1,3	27,88± 3,0*
<b>Hb</b>	5,90±0,9	7,78 ± 0,6*	7,10 ± 1,3	8,81 ± 1,0*
<b>RBC</b>	1,43±0,2	1,69±0,3*	1,38 ± 0,5	1,74 ± 0,3
<b>VCM</b>	173±24,7	174,1±33,4	167,9 ±32,3	157,14±19,6
<b>HCM</b>	41,27±6,4	48,70±8,9*	49,70 ± 1,2	50,19 ±5,0
<b>CHCM</b>	24,21±3,5	28,35±5,6*	28,91 ± 6,2	31,82 ± 4,3
<b>MHb</b>	3,37±0,8	3,59 ± 1,2	4,32 ± 0,5	3,89 ± 0,7

(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=12$ ). O hematócrito (Ht) e a metahemoglobina (MHb) estão expressos em (%); hemoglobina (Hb) como ( $\text{g } 100\text{mL}^{-1}$ ); contagem de células vermelhas (RBC) como ( $10^6/\text{mm}^3$ ); volume corpuscular médio (VCM) como ( $\mu\text{mm}^3$ ); hemoglobina corpuscular média (HCM) como ( $\text{pg } \text{cél}^{-1}$ ); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) como (%).

Os peixes expostos à LCH por 96 horas apresentaram diminuição na concentração de  $\text{Na}^+$  (15%) e de  $\text{Cl}^-$  (19%). Também se observou redução de 13% no teor de proteína plasmática dos peixes expostos. Os peixes recuperados também apresentaram diminuição de 5,4% nos teores de  $\text{Na}^+$  plasmático, não se observando diferenças nos demais parâmetros (Tabela 5).

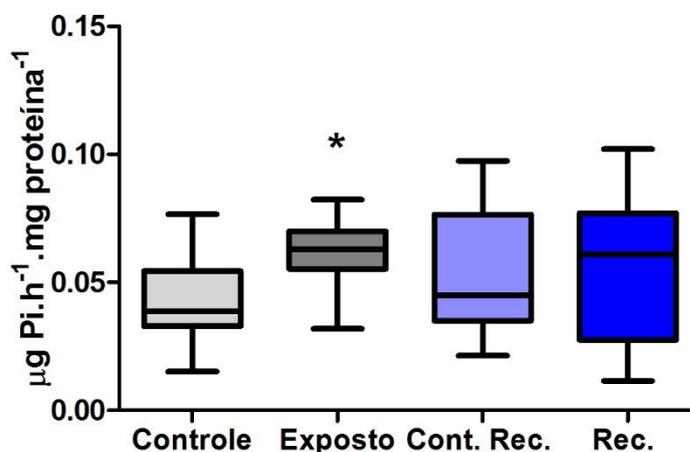
**Tabela 5.** Íons plasmáticos de peixes exposto à LCH e de peixes recuperados.

Parâmetro	Controle	Exposição	Controle Recuperação	Recuperação
<b><math>\text{Na}^+</math></b>	161,02±12,0	136,25 ± 17,2*	156,44±9,6	147,92±7,1*
<b><math>\text{K}^+</math></b>	4,87±0,5	5,01±0,6	4,25±0,5	4,13±0,7
<b><math>\text{Cl}^-</math></b>	131,24±4,7	105,9±33,7*	139,41±11,1	140,44±6,0
<b>Proteína</b>	47,68±5,8	38,24±10,4*	40,98±3,7	44,01±4,0

(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=12$ ). Os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  estão expressos em ( $\text{mEq mL}^{-1}$ ); a proteína está expressa em  $\text{mg mL}^{-1}$  de plasma<sup>-1</sup>.

A atividade de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (NKA) branquial de matrinxãs expostos à LCH apresentou um aumento de 42%. Em peixes recuperados, esta atividade não foi diferente (Figura 19).

**Figura 9.** Atividade específica de NKA branquial de matrinxãs expostas à LCH e de matrinxãs recuperados.

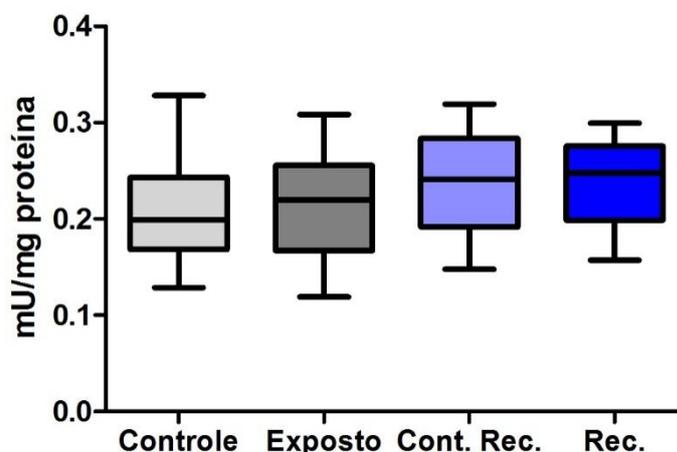


(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como *box plots*, sendo que as extremidades superior e inferior mostram os quartis superiores e inferiores, e a linha horizontal representa a mediana ( $n=12$ ). A barra representa o desvio padrão.

### 5.2.3. Atividade da AChE cerebral

A atividade da AChE não foi diferente em nenhum dos momentos avaliados (Figura 20).

**Figura 10.** Atividade específica da AChE cerebral de peixes expostos à LCH e de peixes recuperados.



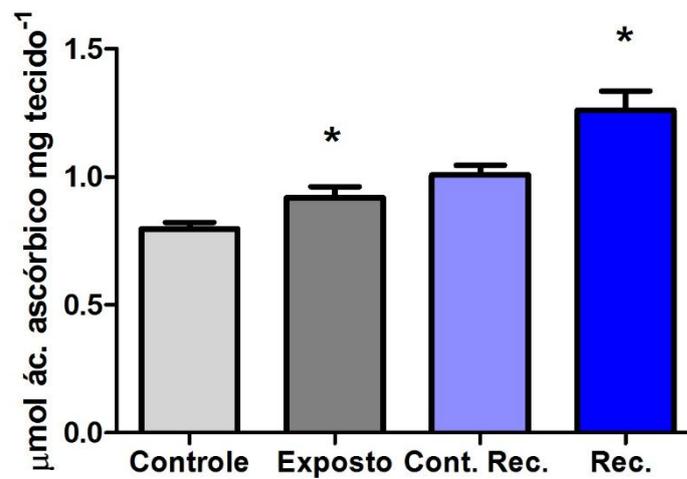
(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como *box plots*, sendo que as extremidades superior e inferior mostram os quartis superiores e inferiores, e a linha horizontal representa a mediana ( $n=12$ ). A barra representa o desvio padrão.

## 5.2.4. Sistema antioxidante

### 5.2.4.1. Cérebro

A exposição à LCH aumentou a concentração de ácido ascórbico em 15% e após a recuperação esse aumento foi de 26% (Figura 21).

**Figura 11.** Concentração de ácido ascórbico em cérebro de matrinxã após exposição a LCH e recuperação.

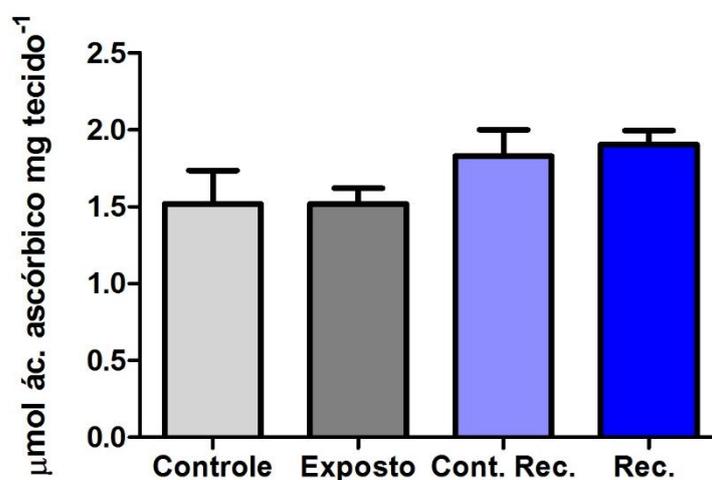


(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n=12$ ).

### 5.2.4.2. Fígado

No fígado não se observou diferença na concentração de ácido ascórbico em nenhuma das condições experimentais (Figura 22).

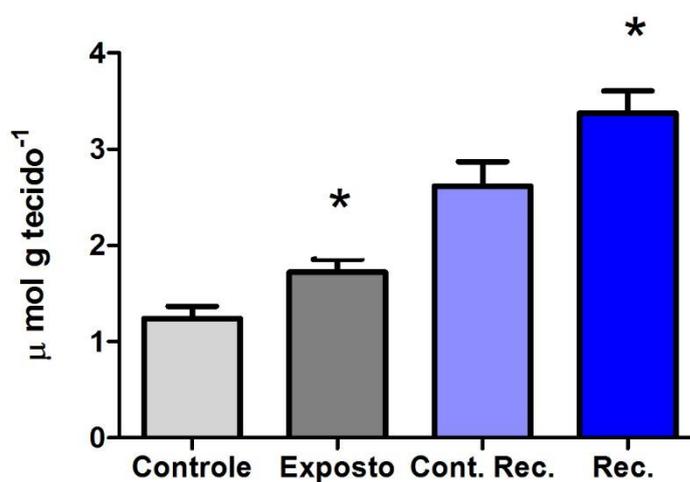
**Figura 12.** Concentração de ácido ascórbico em fígado de matrinxã após exposição a LCH e recuperação.



(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n=12$ ).

O teor de glutaciona reduzida (GSH) hepática aumentou 41% após a exposição e 29% após a recuperação (Figura 23).

**Figura 13.** Concentração de glutaciona reduzida em fígado de matrinxã após exposição a LCH e recuperação.



(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n=12$ ).

No fígado, após a exposição, a atividade de SOD diminuiu 37,4%, a atividade de CAT diminuiu 35,5% e a de GPx diminuiu 32,2%. Não foram observadas diferenças nas atividades de GST e de G6PDH (Tabela 6). Após a recuperação, a atividade de SOD diminuiu 19,3%; a atividade da CAT foi reestabelecida e a atividade de GPx aumentou 141%. Nas atividades de GST e de G6PDH não foram observadas alterações (Tabela 6).

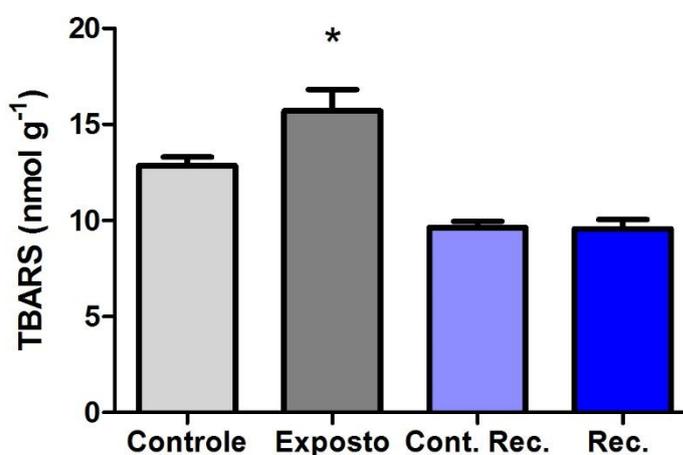
**Tabela 6.** Atividade das enzimas antioxidantes e de G6PDH em fígado de peixes expostos à LCH e de peixes recuperados.

Parâmetro	Controle	Exposição	Controle Recuperação	Recuperação
SOD	4,06 ± 1,3	2,54 ± 0,9*	4,08 ± 0,6	3,29 ± 0,5*
CAT	0,31 ± 0,1	0,20 ± 0,07*	0,52 ± 0,2	0,54 ± 0,2
GPx	0,62 ± 0,2	0,42 ± 0,2*	0,80 ± 0,2	1,93 ± 0,4*
GST	8,04 ± 1,2	8,19 ± 1,7	9,49 ± 1,8	10,38 ± 2,0
G6PDH	65,79 ± 18,6	52,70 ± 16,5	33,67 ± 15,5	33,70 ± 14,9

(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão ( $n=12$ ). As atividades enzimáticas estão expressas em UI mg proteína<sup>-1</sup>.

A presença de TBARS no fígado dos peixes expostos aumentou 22,1%, mas não se observou alteração nos peixes recuperados (Figura 24).

**Figura 14.** Formação de TBARS em fígado de matrinxã após exposição à LCH e recuperação.



(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão ( $n=12$ ).

### 5.2.4.3. Rim

Não foi possível ensaiar a atividade de SOD em rim, tendo em vista a quantidade de tecido disponível. A atividade de CAT renal diminuiu 30,8% e a de GPx aumentou 71,6%. Não se observou diferença na atividade da G6PDH após a exposição (Tabela 7).

Após a recuperação, a atividade de CAT aumentou 39,3% e na atividade de GPx não se observou alteração. A atividade da G6PDH diminuiu 49% nos peixes recuperados (Tabela 7).

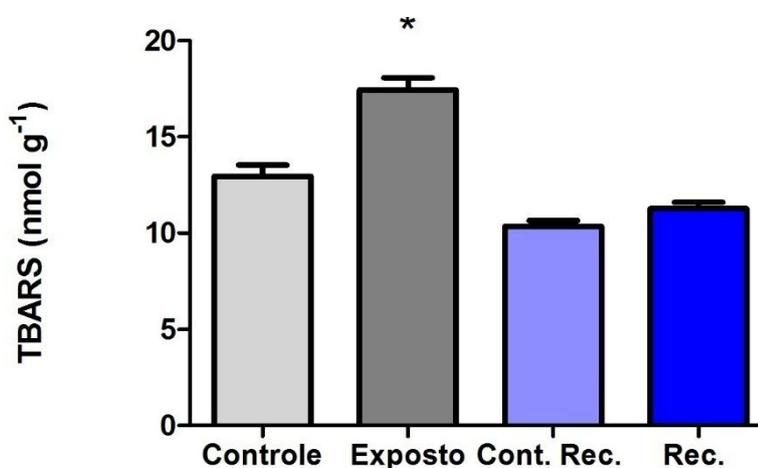
**Tabela 7.** Atividade das enzimas antioxidantes e da G6PDH em rim de peixes expostos à LCH e de peixes recuperados.

Parâmetro	Controle	Exposição	Controle Recuperação	Recuperação
<b>CAT</b>	47,24 ± 10,9	32,67 ± 8,5*	62,19 ± 17,6	86,65 ± 13,7*
<b>GPx</b>	0,06 ± 0,01	0,11 ± 0,02*	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,03
<b>G6PDH</b>	36,05 ± 7,8	32,01 ± 9,3	124,9 ± 50,2	63,82 ± 19,1*

(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão ( $n=12$ ). As atividades enzimáticas estão expressas em UI mg proteína<sup>-1</sup>.

A formação de TBARS aumentou 34,6% nos peixes expostos, porém, não se observou diferença após a recuperação (Figura 25).

**Figura 15.** Formação de TBARS em rim de matrinxã após exposição à LCH e recuperação.



(\*) indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão ( $n=12$ ).

#### 5.2.4.4. Brânquias

Em brânquias, apenas na atividade de G6PDH se observou diminuição de 40% (Tabela 8). Após a recuperação, observou-se aumento de 33,3% na atividade da CAT, enquanto as atividade de SOD, GPx e G6PDH não diferiram (Tabela 8).

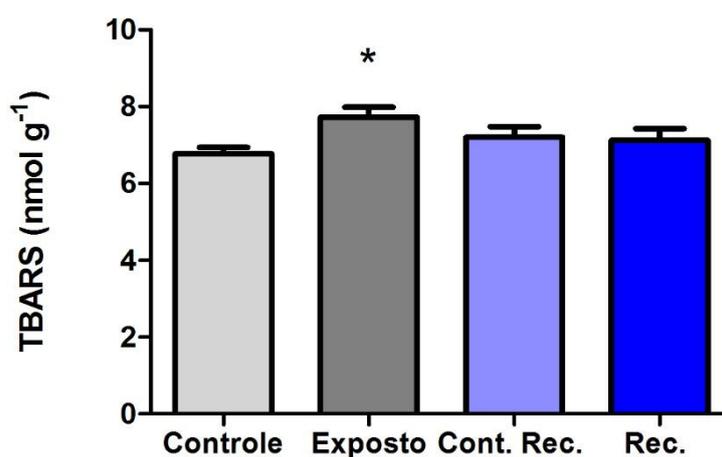
**Tabela 8.** Atividade das enzimas antioxidantes e da G6PDH em brânquia de peixes expostos a LCH e de peixes recuperados.

Parâmetro	Controle	Exposição	Controle Recuperação	Recuperação
<b>SOD</b>	0,568±0,19	0,449±0,20	0,453±0,15	0,490±0,20
<b>CAT</b>	0,014 ± 0,004	0,017 ± 0,005	0,009 ± 0,001	0,012 ±0,003*
<b>GPx</b>	0,060 ± 0,02	0,055 ± 0,02	0,053 ± 0,02	0,070 ± 0,03
<b>G6PDH</b>	33,73 ± 7,7	20,33 ± 4,8*	27,98 ± 8,7	22,79 ± 2,0

(\*) indica diferença significativa ( $P<0,05$ ). Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (n=12). As atividades enzimáticas estão expressas em UI mg proteína<sup>-1</sup>.

Foi observado aumento de 14,1% de TBARS em peixes expostos, porém, não se observou essa alteração após a recuperação (Figura 26).

**Figura 16.** Formação de TBARS em brânquias de matrinxã após exposição à LCH e recuperação.



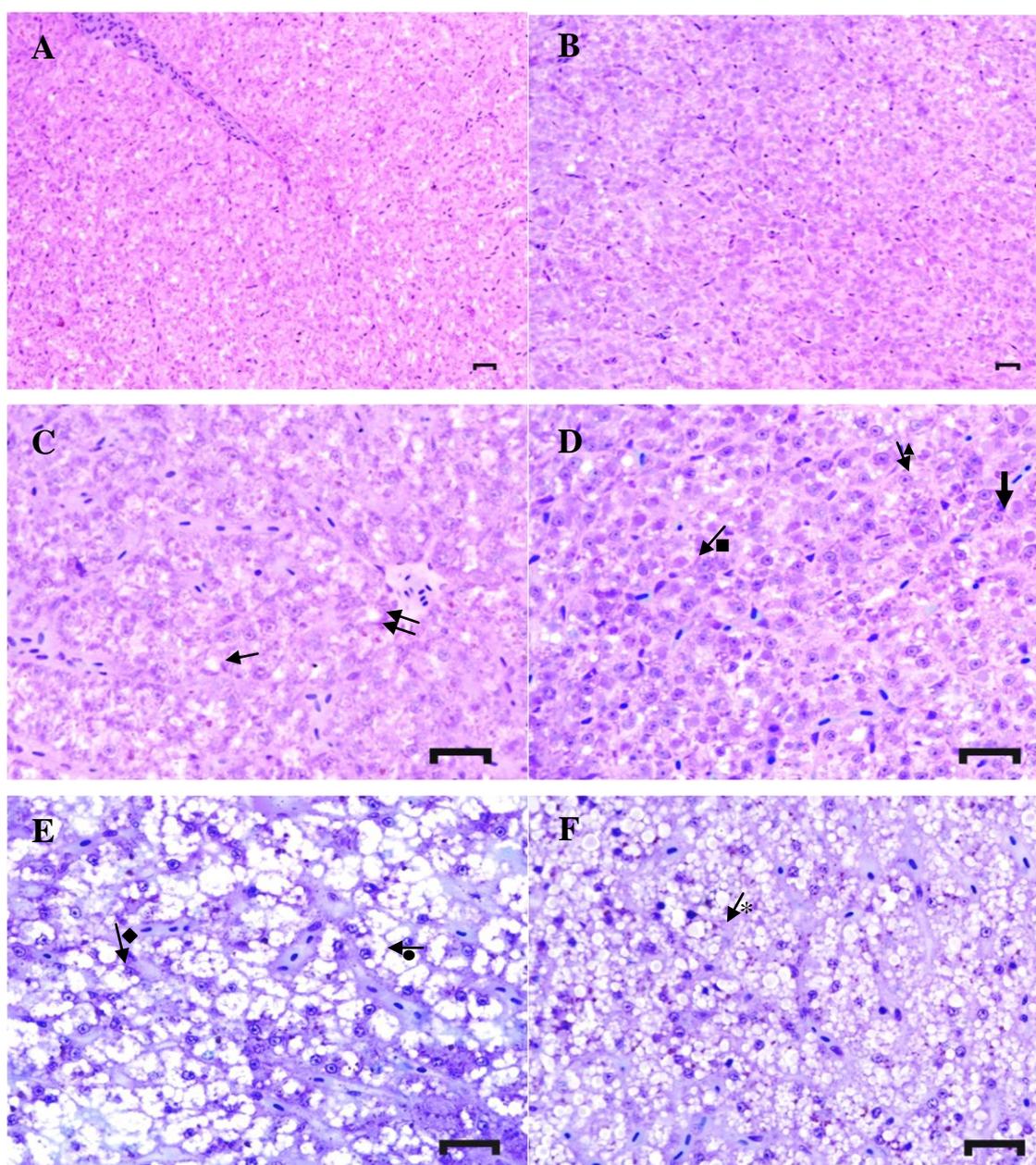
(\*) indica diferença significativa ( $P<0,05$ ). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão (n=12).

### 5.2.5. Análises histopatológicas

#### Fígado

Os peixes expostos à LCH apresentaram alterações histopatológicas no fígado, tais como mostradas na Figura 27.

**Figura 17.** Fotomicrografia de fígado de *B. amazonicus* expostos à LCH.



**A)** Controle Exposição. **B)** Controle Recuperação. **C)** Controle Exposição. **D)** Controle Recuperação. **E)** Exposição à LCH. **F)** Recuperação de 7 dias. Seta simples: gordura. Seta dupla: vacuolização citoplasmática. Seta com asterisco: grânulos eosinófilos. Seta com triângulo: hipertrofia celular. Seta larga: deslocamento nuclear. Seta com quadrado: degeneração citoplasmática. Seta com círculo: Deformação da membrana

celular. Seta com losango: Deformação da membrana nuclear. Coloração: Azul de toluidina e Fucsina básica. Escala: 20µm.

O IAH de peixes expostos e de recuperados indicam alterações hepáticas de moderadas a severas, enquanto que peixes não expostos apresentaram apenas danos de leves a moderados (controle: 19,4; exposto: 45,7; controle da recuperação: 17,4; recuperados: 44,9). A Tabela 9 apresenta a frequência das alterações hepáticas em matrinxãs expostos à LCH e em peixes recuperados.

**Tabela 9.** Frequência de alterações em fígado de *B. amazonicus* expostos à LCH e recuperados.

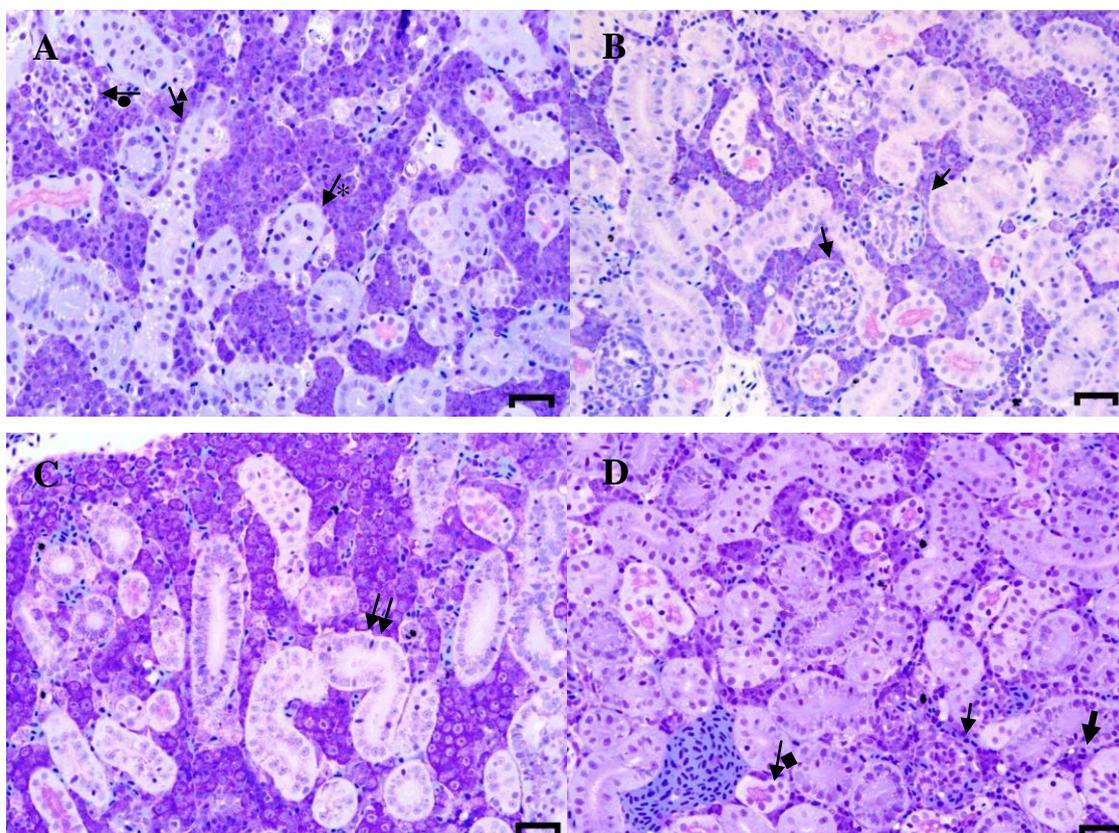
Estágio das alterações	Lesões	Tratamento			
		Controle	Exposto	Controle recuperação	Recuperação
<b>Estágio I</b>	Hipertrofia nuclear	+	+	+	0
	Hipertrofia celular	++	++	+	++
	Atrofia nuclear	++	++	+	++
	Atrofia celular	0	0	+	++
	Aumento da frequência de vasos	++	+++	+	+
	Deformação do contorno nuclear	+	+++	+	++
	Deformação do contorno celular	+	+++	++	+++
	Núcleos na periferia da célula	+++	+++	+++	+++
	Desarranjo dos cordões hepáticos	+	+++	+	+++
	Presença de melanomacrófagos	0	0	0	0
	Vacuolização citoplasmática	++	+++	++	+++
	Grânulos eosinófilos	++	+++	++	+++
<b>Estágio II</b>	Vacuolização nuclear	+	++	+	++
	Degeneração nuclear	+	++	0	++
	Degeneração citoplasmática	++	+++	+	+++
	Núcleos picnóticos	0	0	0	0
	Ausência de nucléolo	0	0	0	0
	Ausência de núcleo	0	0	0	0
	Rompimento celular	0	0	0	0
	Estagnação biliar	0	0	0	0
	Ruptura de vasos	0	0	0	0
Congestão	0	0	0	0	
<b>Estágio III</b>	Necrose Focal	0	0	0	0
	Necrose Total	0	0	0	0

0 = ausente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente.

## Rim

Os peixes expostos à LCH apresentaram alterações histopatológicas no rim, tais como mostradas na Figura 28.

**Figura 18.** Fotomicrografia de rim de *B. amazonicus* expostos à LCH.



**A)** Controle Exposição. **B)** Controle Recuperação. **C)** Exposição à LCH. **D)** Recuperação de 7 dias. Seta com asterisco: Túbulo distal. Seta com triângulo: túbulo proximal. Seta com círculo: Glomérulo. Seta simples: redução do espaço de Bowman. Seta dupla: degeneração granular. Seta larga: vacuolização celular. Seta com quadrado: oclusão da luz tubular. Coloração: Azul de toluidina e Fucsina básica. Escala: 20µm.

O IAH foi indicativo de alterações severas no rim de peixes expostos, enquanto nos outros animais as alterações foram de moderadas a severas (controle: 30,7; exposto: 50,3; controle da recuperação: 35,4; recuperados: 36,4). A tabela 10 apresenta a frequência das alterações encontradas em rim de matrinxãs expostos à LCH e de peixes recuperados.

**Tabela 10.** Frequência de alterações em rim de *B. amazonicus* expostos à LCH e recuperados.

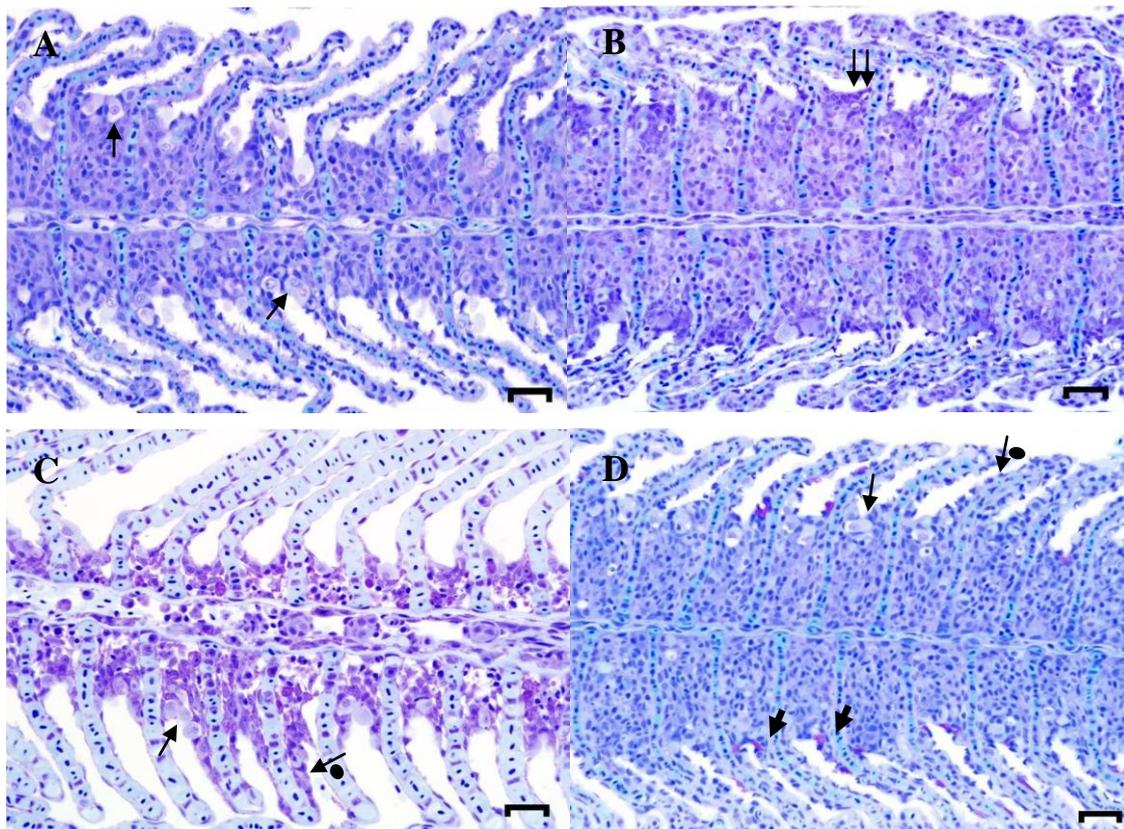
Estágio das alterações	Lesões	Tratamento			
		Controle	Exposto	Controle recuperação	Recuperação
<b>Estágio I</b>	Hipertrofia celular	+	++	+	+
	Hipertrofia nuclear	0	0	0	0
	Vacuolização celular	++	+++	+	+++
	Dilatação da luz tubular	0	0	0	0
	Túbulos em regeneração	0	0	0	0
	Dilatação dos capilares	0	0	0	0
	Espessamento do endotélio capilar	0	0	0	0
	Aumento do volume glomerular	0	0	0	0
<b>Estágio II</b>	Rompimento celular	0	0	0	0
	Degeneração granular	+	++	+	++
	Degeneração hialina	+	+++	0	+
	Oclusão da luz tubular	+	+++	+	++
	Degeneração tubular	+	0	+	+
	Degeneração tecidual	0	0	0	0
	Novos néfrons	0	0	0	0
	Redução do espaço de Bowman	+	+++	+	++
	Aumento do espaço de Bowman	0	0	0	0
	Presença de hemácias no espaço de Bowman	+	+++	+	++
	Hemorragia	0	0	0	+
	Gordura	0	0	0	0
<b>Estágio III</b>	Necrose	0	0	0	0

0 = ausente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente.

### **Brânquias**

As brânquias dos peixes e dos recuperados apresentaram alterações histopatológicas devidas à exposição à LCH (Figura 29).

**Figura 19.** Fotomicrografia de brânquia de matrinxã *B. amazonicus* expostos à LCH.



**A)** Controle Exposição. **B)** Controle Recuperação. **C)** Exposição à LCH. **D)** Recuperação. Seta simples: proliferação de células cloreto. Seta dupla: hiperplasia do epitélio lamelar. Seta com círculo: hipertrofia do epitélio lamelar. Seta larga: células mucosa. Coloração: Azul de toluidina. Escala: 20 $\mu$ m.

Apesar das alterações observadas, o IAH de todos os peixes avaliados é sugestivo de funcionamento normal do órgão (controle: 5,06; exposto: 4,7; controle da recuperação: 6,85; recuperados: 4,1). A tabela 11 apresenta a frequência das alterações encontradas em brânquias de matrinxãs expostos à LCH e de peixes recuperados.

**Tabela 11.** Frequência de alterações em brânquias de *B. amazonicus* expostos à LCH e recuperados.

Estágio das alterações	Lesões	Tratamento			
		Controle	Exposto	Controle recuperação	Recuperação
<b>Estágio I</b>	Hipertrofia do epitélio das lamelas	+	++	+	+++
	Hiperplasia do epitélio das lamelas	+	++	++	++
	Fusão das lamelas	0	0	++	+++
	Dilatação capilar	0	0	0	0
	Descolamento epitelial	+	+	0	0
	Constricção capilar	0	0	0	0
	Proliferação das células cloreto	++	+++	++	++
	Proliferação das células mucosas	0	+	0	+
	Congestão	+	+	0	0
	Edema	+	0	0	0
<b>Estágio II</b>	Aneurisma lamelar	+	0	0	0
	Ruptura epitelial (hemorragia)	0	+	0	0
<b>Estágio III</b>	Necrose focal	0	0	0	0
	Necrose total	0	0	0	0

0 = ausente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente.

### 5.2.6. Teste do micronúcleo (MN) e alterações nucleares eritrocitárias (ANE)

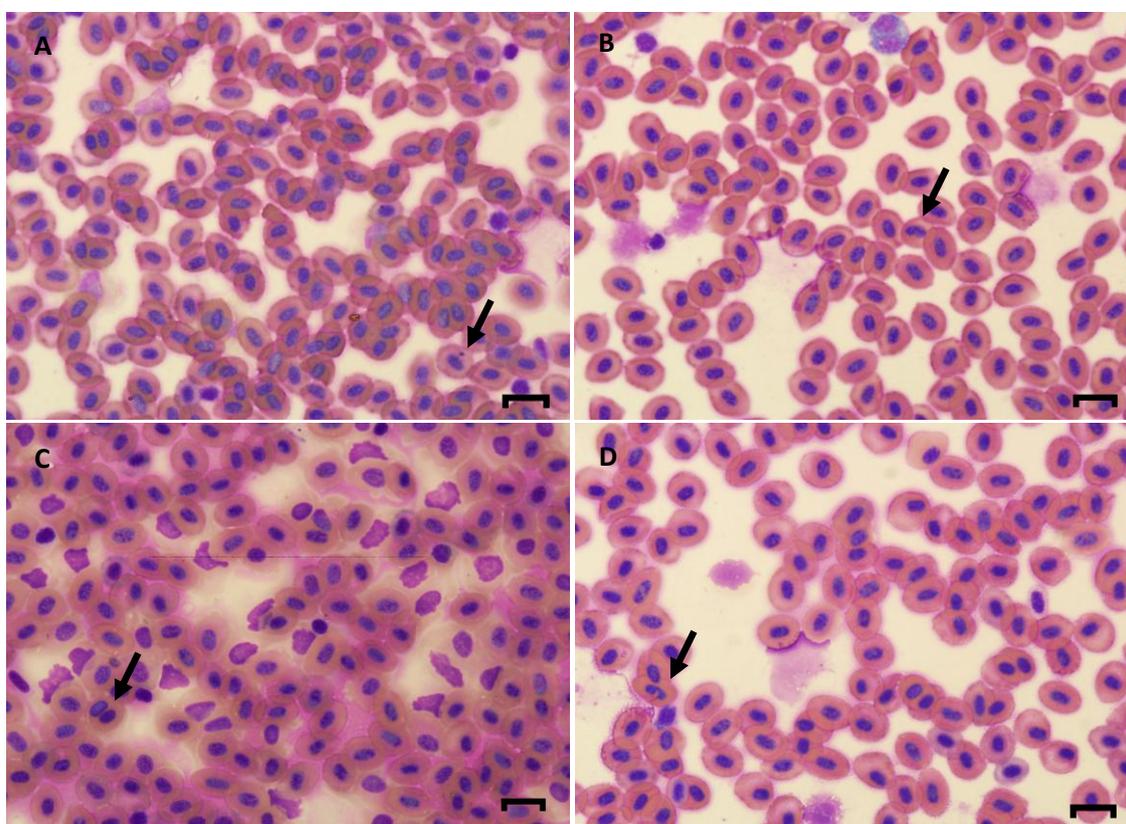
Os resultados apresentados consideram os MN e as ANE em conjunto. A frequência de MN foi muito baixa em todos os peixes, impossibilitando tratamento estatístico adequado. Dessa forma, ao se observar as alterações em conjunto, é possível submetê-las à avaliação estatística. Não foram observadas diferenças na formação de MN e ANE em nenhum dos peixes avaliados (Tabela 12).

**Tabela 12.** Formação de micronúcleo e alterações nucleares eritrocíticas por mil células (média % ± erro padrão) em sangue de *B. amazonicus* expostos à LCH e recuperados.

Parâmetro	Controle	Exposição	Controle Recuperação	Recuperação
Formação de micronúcleo e ANE (‰)	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1

A Figura 30 mostra os MN e algumas ANE encontradas nos peixes das diferentes situações avaliadas.

**Figura 20.** Fotomicrografia de eritrócitos de matrinxã *B. amazonicus* expostos à LCH.



**A)** Exposto – a seta indica a ocorrência de MN **B)** Controle – a seta indica ANE (formato de rim). **C)** Controle da recuperação – a seta indica ANE (eritrócito binucleado). **D)** Exposto – a seta indica ANE (formato de rim). Coloração: MGGW. Escala: 20µm.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Estimativa da CL50;96h e sinais de intoxicação

Considerando-se a classificação quanto ao Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) do IBAMA (2012), no que tange ao valor de CL 50;96h, o piretroide LCH pode ser classificado como altamente tóxico ao matrinxã, dado ser este menor que  $1 \text{ mgL}^{-1}$ . A hipersensibilidade de peixes à intoxicação por piretroides é devida parcialmente às diferenças espécie-específicas no metabolismo deste composto e principalmente à alta sensibilidade de seu sistema nervoso (MOORE; WARING, 2001). Admite-se que os peixes sejam deficientes em mecanismos de metabolização desses compostos, devido à carência de carboxilesterases, enzimas responsáveis por sua hidrólise (BRADBURY; COATS, 1989; HAYA, 1989). Há relatos recentes acerca da alta toxicidade da LCH para peixes (Tabela 12):

**Tabela 132.** Valores da CL50;96h de espécies de peixes expostas a LCH.

<b>Espécie</b>	<b>CL50;96h</b>	<b>Autores</b>
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	$1,4 \mu\text{g L}^{-1}$	Bacchetta et al. (2014)
<i>Labeo rohita</i>	$2,72 \mu\text{g L}^{-1}$	Gadhawe et al. (2014)
<i>Brycon amazonicus</i>	$6,5 \mu\text{g L}^{-1}$	<b>Presente estudo</b>
<i>Clarias batrachus</i>	$5,0 \mu\text{g L}^{-1}$	Kumar et al. (2011a)
<i>Danio rerio</i>	$0,053 \mu\text{g L}^{-1}$	Ahmad et al. (2011)
<i>Gambusia affinis</i>	$1,107 \mu\text{g L}^{-1}$	Güner (2009)
<i>Clarias batrachus</i>	$28,84 \text{ mg L}^{-1}$	Saravanan et al. (2009)
<i>Brachydanio rerio</i>	$1,94 \mu\text{g L}^{-1}$	Wang et al. (2007)
<i>Channa punctatus</i>	$7,92 \mu\text{g L}^{-1}$	Kumar et al. (2007)
<i>Cirrhinus mrigala</i>	$3 \mu\text{g L}^{-1}$	Velmurugan et al. (2007)
<i>Brachydanio rerio</i>	$1,21 \mu\text{g L}^{-1}$	Gu et al. (2007)

A alta toxicidade de piretroides para peixes não se limita à LCH. Outros piretroides também apresentam valores de CL50;96h que mostram essa característica. A CL50;96h da deltametrina para *Clarias gariepinus* é de  $40 \text{ mg L}^{-1}$  (DATTA; KAVIRAJ, 2003), para *Onchorhynchus mykiss* é de  $0,69 \mu\text{g L}^{-1}$  (URAL; SAGLAM, 2005); para

*Catla catla* é de 4,84  $\mu\text{g L}^{-1}$  (VANI et al., 2011); para *B. amazonicus* é de 2,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  (MORAES et al., 2013b). A CL50;96h da cipermetrina para *Oreochromis niloticus* é de 2,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  (BRADBURY; COATS, 1989); para *O. mykiss* é de 31,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  (VELISEK et al., 2006); para *Cyprinus carpio* é de 2,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  (SAHA; KAVIRAJ, 2008); para *B. amazonicus* é de 36  $\mu\text{g L}^{-1}$  (MORAES et al., 2013b). Alevinos de tilápia são mais sensíveis à LCH do que à deltametrina e à cipermetrina; o que é evidenciado por valor mais baixo da CL50;96h do primeiro composto (BAJET et al., 2012). Embora se observe grande amplitude nos valores de toxicidade aguda de diferentes piretroides sobre diferentes espécies de peixes, é nítida sua alta toxicidade a estes animais, visto ser a maioria dos valores da ordem de microgramas por litro.

Vários fatores podem influenciar as respostas dos peixes à LCH; o estágio de vida, a qualidade da água, a formulação do composto e outras. Segundo Gu e colaboradores (2007), a diferença na toxicidade (CL50;96h) de cinco formulações de LCH (suspensão concentrada, emulsão aquosa, pó molhável, emulsão concentrada e micro emulsão) para *B. rerio* varia de 0,98 a 7,55  $\mu\text{g L}^{-1}$  (emulsão concentrada e suspensão concentrada, respectivamente).

A toxicidade da LCH também pode estar relacionada ao seu enantiômero  $\gamma$ -cialotrina, dotado de atividade inseticida (GIDDINGS et al., 2009). Embora as CL50;96h da LCH e da  $\gamma$ -cialotrina sejam praticamente as mesmas para *B. rerio* (1,94 e 1,93  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente), o camarão *Macrobrachium nipponensis* mostra sensibilidade diferenciada a esses compostos, variando de 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$  para LCH a 0,28  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a  $\gamma$ -cialotrina (WANG et al., 2007). Tais dados mostram que a toxicidade pode ser dependente da estereoquímica do piretroide.

Os sinais de intoxicação observados no presente trabalho sugerem alterações metabólicas oriundas da ação de LCH. Dentre as características dos piretroides destacamos a lipofilicidade (KUMAR; SHARMA; PANDEY, 2011a; KAVIRAJ; GUPTA, 2014) que facilita sua adesão às brânquias e dificulta o processo respiratório.

Ademais, a neurotoxicidade da LCH pode ser responsável pelas alterações dos padrões natatórios, visto ser esta atividade dependente do desempenho adequado do sistema nervoso. Piretroides podem afetar o desempenho natatório de peixes, como observado em *Oncorhynchus mykiss* exposto à S-deltametrina (HUGHES; BIRÓ, 1993) e à deltametrina (GOULDING et al., 2013); e em *Salvelinus fontinalis* exposto à resmetrina (PAUL; SIMONIN, 1996). A espécie *L. rohita* quando exposta à LCH apresenta natação errática, perda de equilíbrio, respiração na superfície e convulsões (GADHAVE et al., 2014); enquanto *Clarias batrachus*, exposta ao mesmo piretroide, apresenta escurecimento de pele, hiperatividade e natação súbita, além das alterações já citadas (KUMAR et al., 2011a).

A CL50;96h da LCH para matrinxã é alta se comparada às encontradas na literatura. Isso permite inferir que esta espécie é menos sensível a este piretroide do que as espécies já avaliadas. No entanto, são necessários estudos com enfoques diferentes (bioconcentração, persistência, transporte) para que sua classificação de periculosidade seja completa, assim como a inferência do seu potencial de dano ao meio ambiente e aos organismos não alvo. Segundo o IBAMA (2012), no uso de agroquímicos próximo a corpos d'água, deve-se evitar os que contenham advertências de toxicidade aos organismos aquáticos, substituindo-os por produtos semelhantes não tóxicos. A legislação brasileira vigente é falha em relação às concentrações de piretroides em águas superficiais, dado que não há limite máximo tolerável para qualquer classe de água. Testes como o de CL50;96h são importantes na elaboração de leis adequadas à proteção e utilização dos recursos hídricos.

## **6.2. Exposição sub-letal**

### **6.2.1. Índice hepatossomático (IHS)**

Parâmetros biométricos, tais como fator de condição e índice hepatossomático, são indicadores gerais do estado de saúde dos peixes e, conseqüentemente, da qualidade de água em que vivem. De acordo com Ensibi e colaboradores (2014), o

IHS é um biomarcador inespecífico influenciado por fatores como sexo, estação do ano, doenças e condições nutricionais. Além disso, esse índice pode ser relacionado à atividade hepática e à desintoxicação, permitindo inferências sobre a exposição a poluentes (FANG et al., 2009). O piretroide LCH não afetou o IHS de *B. amazonicus*, tanto após a exposição quanto a recuperação. Desta observação, inferimos que o tempo de exposição não foi suficiente para um gasto de energia com a desintoxicação capaz de modificar o peso dos animais e/ou do fígado. Wenju e colaboradores (2009) reportam uma diminuição no IHS em tilápias híbridas (*O. niloticus* x *O. aureus*) expostas ao fenantreno por 14 dias. Porém, esse índice não se modifica após 4 e ou 8 dias de intoxicação. Outra hipótese para essa observação é a de que o estado nutricional de *B. amazonicus* antes do período experimental tenha contribuído para uma correlação estável entre peso do fígado e do animal, dado que os animais encontravam-se em boas condições de saúde e nutricionais, e que a alimentação foi suspensa apenas 24 horas antes do início da intoxicação. Outras espécies expostas a piretroides apresentam respostas divergentes em relação a esse parâmetro: *C. carpio* exposto à deltametrina por até 30 dias não apresenta diferenças significativas no IHS (ENSIBI et al., 2014); entretanto, *C. gariepinus* exposto ao fenvalerato por 96 horas exibe diminuição no IHS (BHATTACHARYA; KAVIRAJ, 2009).

### **6.2.2. Parâmetros hematológicos e balanço iônico**

A avaliação hematológica pode ser útil no monitoramento da saúde dos peixes, visto que sua interpretação se correlaciona a fatores intrínsecos e extrínsecos ao organismo, ligados à morfologia das células sanguíneas e aos valores hematimétricos obtidos (CLAUSS et al., 2008). Embora haja variações espécie-específicas nos valores hematológicos de peixes, esses parâmetros são convenientes à avaliação dos efeitos de pesticidas nesses animais. Os índices hematológicos exibem sensibilidade diferente aos vários fatores ambientais e químicos. A contagem de eritrócitos é um índice relativamente estável, mantido pelo animal dentro de padrões fisiológicos por

meio de vários mecanismos de compensação, especialmente sob estresse (VUTUKURU, 2005). A concentração de hemoglobina reflete o suprimento orgânico de oxigênio mantido o mais estável possível (VUTUKURU, 2005).

O aumento de RBC, Ht, Hb, HCM e CHCM observado em *B. amazonicus* após exposição à LCH é indicativo de falhas no suprimento de oxigênio, típicas de condição de hipóxia. Tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetido à hipóxia por 12 horas exibe aumento na concentração de Hb, aumento no RBC e no HCM (AFFONSO et al., 2002). Tuvira (*Gymnotus carapo*) exposta à hipóxia apresenta aumento no Ht, no RBC e na concentração de Hb total (MORAES et al., 2002). A estimulação excessiva do sistema nervoso central, característica da intoxicação por piretroides, pode levar à hipóxia desse tecido e, conseqüentemente, à anóxia dos tecidos periféricos (CASIDA et al., 1983; PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2007). Como ressaltado anteriormente, o caráter lipofílico dos piretroides facilita sua adesão às brânquias dificultando o processo respiratório. Dessa forma, a atividade respiratória pode ter sido prejudicada, contribuindo assim para as alterações hematológicas observadas.

A liberação de catecolaminas, observada em peixes expostos a estressores, causa aumento de Ht, RBC e Hb (BONGA, 1997). O aumento desses componentes hemáticos pode ser resultante de contração esplênica para atender à demanda de oxigênio. Os processos de desintoxicação requerem significativo dispêndio energético, quer para a remoção quer para o suprimento de metabólitos (HAMMER, 1995), e o fornecimento adequado de oxigênio para os tecidos é parte fundamental deste sistema.

*Pacus (Piaractus mesopotamicus)* expostos à  $0,7 \mu\text{gL}^{-1}$  de LCH por 96 horas não apresentam diferenças significativas nos parâmetros hematológicos (RBC, Ht, Hb, HCM, VCM e CHCM) avaliados (BACCHETTA et al., 2014). Em *Clarias gariepinus* exposto ao mesmo xenobiótico, observa-se reduções significativas de Ht, RBC e Hb (YEKEEN; FAWOLE; BAKARE, 2013). As alterações hematológicas em peixes de água doce oriundas da exposição a outros piretroides do tipo II assemelham-se às

encontradas neste estudo. Cascudo (*Ancistrus multispinis*) injetado com 0,3 mg Kg<sup>-1</sup> de deltametrina (PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2007) e matrinxã (*B. amazonicus*) exposto a 7,2 µg L<sup>-1</sup> de cipermetrina por 96 horas (MORAES, 2013a) apresentam aumento significativo no número de eritrócitos (RBC) e nos níveis de Hb. *Rhamdia quelen* exposto à 2,5 mg L<sup>-1</sup> de cipermetrina exibe Ht, Hb e RBC aumentados (MONTANHA et al., 2014). *B. amazonicus* exposto a 0,26 µg L<sup>-1</sup> de deltametrina por 24 horas apresenta aumento de Ht, CHCM e HCM e 48 horas de exposição observa-se aumento da Hb, do VCM e do HCM (AVILEZ; SOARES, comunicação pessoal).

Outras espécies expostas à piretroides apresentam respostas hematológicas opostas às observadas neste estudo. *Labeo rohita* exposto à cipermetrina apresenta diminuição no RBC, nos valores de Hb e de Ht (ADHIKARI et al., 2004). Esta espécie exposta a concentrações sub-letais de fenvalerato apresenta aumento de células vermelhas (RBC), de Hb e de CHCM, sendo que o Ht e o VCM mostram redução (PRUSTY et al., 2011). Carpas (*Cyprinus carpio*) expostas à 10 µg L<sup>-1</sup> de ciflutrina por 48 horas e por 7 dias não mostram diferenças nos valores de Ht ou de volume corpuscular médio (SEPICI-DINÇEL et al., 2009). Essa espécie exposta à 0,13 mg L<sup>-1</sup> de deltametrina por 96 horas mostra diminuição dos valores de Hb, RBC e Ht (SVOBODOVÁ et al., 2003). *Catla catla* exposta a 1,61 µg L<sup>-1</sup> de deltametrina por 45 dias apresenta diminuição no RBC e na Hb (VANI et al., 2011).

Após a recuperação de 7 dias em água livre do xenobiótico, tanto o hematócrito como a hemoglobina total dos peixes permaneceram elevados. Embora os valores de RBC não sejam diferentes do controle, o aumento de Ht e Hb sugere a manutenção da deficiência nas funções respiratórias, ainda que estas alterações sejam mais sutis que as observadas após a exposição. *L. rohita* exposto a 0,80 µg L<sup>-1</sup> de cipermetrina por 28 dias, apresenta completa recuperação do RBC após 90 dias em água livre do xenobiótico (ADHIKARI et al., 2004). O conhecimento do tempo necessário à completa recuperação dos peixes é de grande ajuda no monitoramento da saúde desses animais.

Sete dias pós exposição não foram suficientes para total recuperação do matrinxã submetido à LCH. No entanto, as alterações observadas são indicativas de processo adaptativo que minimizaram os danos advindos da intoxicação. Segundo Kaviraj e Gupta (2014), as alterações hematológicas são de pronta ocorrência e úteis na detecção dos efeitos de xenobióticos, porém, muitas vezes, são contraditórias.

Vários compostos podem aumentar a formação de MHb; forma em que o ferro hemínico é  $Fe^{3+}$ , incapaz de se ligar e transportar o  $O_2$ . A exposição de peixes à piretroides pode resultar em danos oxidativos (VARANKA et al., 2002; SAYEED et al., 2003; PARVEZ; RAISUDDIN, 2005; ROSSI, 2013; MORAES, 2013a) e, segundo Oost e colaboradores (2003), a formação de MHb pode ser uma consequência da sucessão de fluxos aumentados de oxiradicais. Tambaqui (*C. macropomum*) exposto ao sulfeto e submetido à hipóxia apresenta altos teores de MHb (AFFONSO, 2002). Segundo estes autores, isso deve-se provavelmente à hipoxemia induzida por estes estressores. O nitrito também causa aumento no teor de MHb de *B. amazonicus*, quando exposto por 96 horas (AVILEZ et al., 2004). Após a exposição sub-letal de 96 horas não houve formação significativa de MHb em matrinxã. O mesmo se deu após a recuperação por 7 dias em água livre do xenobiótico. Um sintoma visível da formação de MHb é a cor marrom do sangue ou das brânquias (LEWIS; MORRIS, 1986), característica essa não observada.

Os dados obtidos nas análises hematológicas de matrinxãs expostos à LCH e recuperados por 7 dias apontam para um quadro de déficit no suprimento de oxigênio, embora não tenha ocorrido formação de MHb. Tal fato sugere que a severidade da intoxicação não foi suficiente para formação deste metabólito, ou que o tempo de exposição não foi suficiente para esta ocorrência. Outra hipótese é que tenha ocorrido a formação de MHb em tempo anterior ao avaliado; a contração esplênica e o aumento resultante de alguns dos parâmetros hematológicos teriam sido suficientes para a reciclagem das moléculas e consequente eliminação deste metabólito.

Nos organismos aquáticos, a manutenção do equilíbrio iônico é de suma importância ao balanço entre entrada de água e saída de íons. A captação de água nos teleósteos de água doce é balanceada por altas taxas de filtração glomerular e fluxo de urina, sendo a perda de sais advinda desses processos compensada pela reabsorção tubular dos íons necessários. A eliminação de íons pela urina e pelo efluxo branquial é balanceada por mecanismos ativos de captação do epitélio branquial e pelo ganho iônico da alimentação (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2008). Os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  têm papel essencial em funções metabólicas e fisiológicas; o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$  são o principais cátion e ânion do fluido extracelular, e o  $\text{K}^+$ , do fluido intracelular (SATHYA et al., 2012).

As ATPases são enzimas altamente conservadas, desempenham um importante papel nos transportes de membrana, inclusive nos transportes iônicos (REDDY; PHILLIP, 1994), e podem ser consideradas indicadores de toxicidade (YADWAD et al., 1990). A absorção de  $\text{Na}^+$  através da membrana basolateral é realizada pela  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  (NKA), a qual está presente em praticamente todas as células animais; esta enzima está presente em maiores concentrações em teleósteos marinhos e em níveis basais nos teleósteos de água doce (MARSHALL, 2002). A NKA atua na osmoregulação de peixes, principalmente no que tange à homeostase iônica em nível celular e de organismo. De acordo com Coats (2008), os piretroides são prejudiciais às ATPases, especialmente àquelas envolvidas no transporte de cálcio, e portanto devem ser investigadas visando a compreensão da toxicidade desses compostos devido a injúrias à osmoregulação.

A exposição à LCH afetou o balanço iônico de *B. amazonicus*, dada a queda nos níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e proteína, concomitante ao aumento da atividade de NKA branquial. A hiponatremia e hipocloremia observadas podem ser resultantes dos mecanismos necessários à manutenção do pH sanguíneo; ademais, embora não avaliados nesse estudo tais alterações podem ter sido acompanhadas de hipernatremia e hiperclorêmia tissulares, dado que as quedas dos níveis iônicos

plasmáticos podem causar aumento tissular desses níveis (McCARTHY; HOUSTON, 1976). Em peixes de água doce, o aumento das perdas iônicas está diretamente associado ao do consumo de oxigênio, estando ambos os fatores relacionados ao aumento de catecolaminas circulantes, característico de situações de estresse (BONGA, 1997).

As brânquias são os principais órgãos da osmoregulação de teleósteos; no entanto, como discutido na seção 6.2.5, o tecido renal exibiu as alterações estruturais mais severas em resposta ao piretroide. As alterações iônicas observadas sugerem, portanto, que as injúrias renais causadas pela LCH resultaram na falta da reabsorção iônica necessária à manutenção do equilíbrio osmótico. *Salmo gairdneri* exposto ao fenvalerato, apresenta excreção aumentada de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , fato atribuído à danos na regulação iônica renal (BRADBURY; McKIM; COATS, 1987). A hipoproteinemia observada no presente estudo corrobora a hipótese de danos causados aos rins, dado que prejuízos nas funções renais podem levar à maior excreção de proteínas ou, ainda, a danos na síntese proteica (SATHYA et al., 2012).

A indução da atividade de NKA branquial pode ter ocorrido em consequência do aumento do transporte ativo dos íons em resposta à toxicidade causada pelo piretroide; além disso, houve aumento das taxas respiratórias devido ao estresse ao qual os animais foram submetidos. O mesmo foi observado em *C. batrachus* exposta a um carbamato (BEGUM, 2011). O aumento da atividade da NKA branquial não está diretamente relacionado à hipertrofia das células cloreto, assim como o aumento das trocas iônicas realizadas nas brânquias, visto que esses fatos dependem da relação entre diferenciação e degeneração das células branquiais (BONGA, 1997). Isso corrobora os dados histológicos e bioquímicos observados no presente estudo.

As concentrações plasmáticas de cortisol elevam-se em resposta ao estresse, inclusive causado por exposição a xenobióticos (BARTON, 2002). Admite-se que peixes expostos à piretroides sofram estresse, como observado em *Clarias gariepinus* exposta à deltametrina (DATTA; KAVIRAJ, 2003); em *Heteropneustes fossilis* exposto

à cipermetrina (SAHA; KAVIRAJ, 2009) e em *Channa punctatus* exposto à LCH e à cipermetrina (KUMAR et al., 2012b). Piretroides também aumentam os níveis séricos de cortisol, como mostrado em *C. carpio* exposto à ciflutrina (SEPICI-DINÇEL et al., 2009) e em *Oncorhynchus mykiss* exposto à LCH (VENTURINI, dados não publicados). Embora os níveis plasmáticos de cortisol não tenham sido determinados nesse estudo, a elevação desses níveis pode ter contribuído para indução da atividade da NKA, dado que elevações no cortisol podem estimular a atividade desta enzima (MARSHALL, 2002; McCORMICK et al., 2008). Além disso, redução dos níveis séricos de proteínas é uma resposta clássica de organismos sob estresse (MARTINEZ et al., 2004; SATHYA et al., 2012) visto que essas podem ser utilizadas para suprir a demanda energética causada pelos processos de desintoxicação. Em *C. punctatus* e *C. batrachus* expostos à cipermetrina o catabolismo de aminoácidos é um dos principais mecanismos de obtenção de energia (KUMAR; SHARMA; PANDEY, 2011b).

Os dados osmorregulatórios obtidos após a exposição permitem ainda inferir que, em resposta ao estresse, houve um aumento da perfusão branquial, levando ao maior influxo de água, concomitantemente à perda de íons. Os dados iônicos e o teor de proteína plasmática evidenciam o ganho de água dos animais, o que pode ter contribuído para o aumento da atividade da NKA branquial.

Carpa (*C. carpio*) exposta à cipermetrina apresenta diminuição dos níveis de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  plasmáticos (SUVETHA et al. 2010), e quando exposta à deltametrina, apresenta diminuição também dos níveis plasmáticos de proteína (SVOBODOVÁ et al. 2003). A carpa (*C. carpio*) exposta à cipermetrina e o *Ancistrus multispinis* exposto à deltametrina apresentam inibição da atividade de NKA branquial (REDDY; PHILIP, 1994; SUVETHA et al., 2010; ASSIS et al., 2009). Porém, *B. amazonicus* exposto à cipermetrina, apresentou aumento na atividade da NKA branquial, concomitantemente à proliferação de células cloreto, dilatação de vasos sanguíneos, aneurisma, e hemorragias branquiais (MORAES, 2013a). A atividade da NKA é um biomarcador de exposição a xenobióticos bastante útil, porém não é específico de intoxicação por

piretroides, tendo em vista as respostas distintas de diferentes espécies expostas a diferentes piretroides.

Após a recuperação, a despeito do restabelecimento da atividade de NKA branquial, o desequilíbrio iônico permaneceu, dada a manutenção de baixos níveis de  $\text{Na}^+$ . A severidade das lesões renais após a recuperação também são menores, o que sugere restauração desses parâmetros, apesar de não ter ocorrido plena restauração do equilíbrio osmótico. Entretanto, o tempo de recuperação avaliado não foi suficiente para o recobro dos valores iniciais.

### 6.2.3. Neurotoxicidade

As esterases são enzimas capazes de hidrolisar ésteres; dentro desse grupo de enzimas, podemos destacar as colinesterases e as carboxilesterases. Entre as colinesterases, a acetilcolinesterase (AChE), é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Quando há inibição desta enzima, o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica pode levar à interrupção da atividade nervosa pela hiperestimulação dos receptores pós-sinápticos de acetilcolina, causando neurotoxicidade. A atividade da AChE é amplamente utilizada como um biomarcador de exposição a organofosforados e carbamatos, visto ser esta a enzima alvo desses compostos. Desde que o principal local de ação dos piretroides é o sistema nervoso, e sua ação não está restrita somente aos canais de  $\text{Na}^+$  voltagem dependentes (BRECKENRIDGE et al., 2009), a atividade da AChE é passível de investigação visando entender a ação neurotóxica desses compostos. De acordo com Toumi e colaboradores (2015), a AChE é um biomarcador de susceptibilidade à deltametrina no cladóceros *Daphnia magna*.

Algumas espécies de peixes expostas a piretroides apresentam inibição da AChE, tais como: *C. carpio* exposto à cipermetrina (REDDY; PHILIP, 1994) e à deltametrina (SZEGLITES et al., 1995); *Cirrhinus mrigala* exposto ao fenvalerato (MUSHIGERI; DAVID, 2005); *C. punctatus* exposto à LCH e à cipermetrina (KUMAR et

al., 2009); *P. mesopotamicus* exposto à deltametrina (ROSSI, 2013) e *O. niloticus* exposto à LCH (PINER; ÜNER, 2014). Todavia, há espécies que não apresentam modificações nesta atividade enzimática, tais como: *Oncorhynchus tshawytscha* exposto ao esfenvalerato (WHEELLOCK et al., 2005); e *Tinca tinca* e *C. carpio* expostos à deltametrina (HERNÁNDEZ-MORENO et al., 2010; ENSIBI et al., 2014).

A inibição da atividade de AChE depende das espécies químicas e biológicas de estudo (FULTON; KEY, 2001), e as diferentes colinesterases presentes nos tecidos podem apresentar respostas distintas à agentes anticolinesterásicos (MONTEIRO et al., 2005). Além disso, os efeitos na atividade enzimática são dose-dependentes e também variam de acordo com o tempo de exposição (FULTON; KEY, 2001; KUMAR et al., 2009). O matrinxã, exposto ao piretroide cipermetrina em formulação comercial, não apresenta modificações na atividade da AChE cerebral, ao passo que a atividade da AChE muscular mostra-se aumentada *in vivo* e inibida *in vitro* (MORAES, 2013a). De acordo com o autor, pode ter ocorrido inibição da AChE cerebral *in vivo* em momento anterior à coleta dos tecidos, o que ativaria um mecanismo compensatório aumentando assim a atividade muscular desta enzima.

Não foram observadas alterações na atividade dessa enzima em cérebro de *B. amazonicus*, quer exposto à LCH quer recuperado. Assim, algumas hipóteses mostram-se plausíveis: a LCH não prejudicaria a atividade da AChE em cérebro de matrinxã durante as 96h de exposição, podendo haver modificações em tempos diferentes do avaliado. É possível também que as isoformas presentes em cérebro de matrinxã não sejam sensíveis à contaminação por LCH ou, ainda, a concentração utilizada não tenha sido suficiente para modificar a atividade dessa enzima e causar efeitos fisiológicos aparentes.

A AChE é uma das enzimas mais utilizadas em estudos toxicológicos com peixes, dado ser a colinesterase mais abundante no tecido nervoso de várias espécies de peixes (NUNES, 2011). No entanto, o grupo de enzimas que atua de forma mais proeminente na desintoxicação de piretroides é o das carboxilesterases (CbE), as

quais realizam a hidrólise do éster em álcool e ácido carboxílico, tornando a molécula mais hidrossolúvel e, conseqüentemente, mais facilmente excretada (SOGORB; VILANOVA, 2002). Apesar dos vários relatos acerca dos efeitos de piretroides na atividade da AChE em peixes, eles são divergentes e não evidenciam a utilidade dessa enzima como um biomarcador de exposição à esses xenobióticos.

Dessa forma, e considerando-se o papel das carboxilesterases nas vias de desintoxicação desses organismos aquáticos, estudos que avaliem a atividade das CbE podem ser mais promissores na escolha de um biomarcador específico da ação de piretroides em peixes.

#### **6.2.4. Sistema antioxidante**

As defesas antioxidantes pertencem a três classes principais: os redutores solúveis em água, tais como a glutathione (GSH) e o ácido ascórbico; as vitaminas lipossolúveis, tais como o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno; e as enzimas, tais como a glutathione peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase (DI GIULIO et al., 1989). Os xenobióticos em geral, e especificamente os pesticidas, podem causar um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) por vários mecanismos, dentre os quais: interferência nos ciclos redox, recebendo ou doando elétrons aos constituintes celulares e conseqüentemente aumentando os níveis de ERO; esgotamento das reservas de intermediários redutores celulares, diminuindo o potencial antioxidante dessas células; inativação das enzimas antioxidantes; interferência com processos que fornecem energia ao metabolismo e à desintoxicação, e modificando processos vitais como a transcrição e tradução, aumentando assim as ERO de maneira indireta (LUSHCHACK, 2011). A sinalização redox induzida por pesticidas é responsável por muitos dos efeitos toxicológicos desses xenobióticos (FRANCO et al., 2009). Dessa forma, avaliando-se os componentes das defesas antioxidantes de organismos expostos a pesticidas, podemos elucidar os mecanismos envolvidos na toxicidade desses compostos.

Os níveis de ácido ascórbico foram avaliados em cérebro de matrinxã após a exposição e a recuperação à LCH. Em ambos os casos, esses mostraram-se aumentados. A elevação dos níveis de ácido ascórbico cerebral de matrinxã expostos à LCH sugere uma resposta adaptativa desse órgão ao estresse oxidativo, tendo em vista que os mecanismos de defesa antioxidantes secundários foram ativados com fins protetores. Em cérebro de ratos expostos à LCH e alimentados com dieta suplementada com ácido ascórbico, observa-se diminuição dos efeitos tóxicos do piretroide oriundos de estresse oxidativo (FETOUI et al., 2008); dado que embasa nossa hipótese de que o aumento do ácido ascórbico teve fins protetores em cérebro de matrinxã.

Como ressaltado anteriormente, o ácido ascórbico é produzido pelos organismos aquáticos (LUSHCHAK, 2011); entretanto, Fracalossi e colaboradores (2001) relatam que vários Characiformes são incapazes de sintetizar essa molécula, dada a falta da enzima L-gulonolactona, responsável pela catálise do último passo na síntese de ácido ascórbico. Visto que os animais do presente estudo não foram alimentados durante todo o período experimental, o aumento dos níveis de ácido ascórbico cerebral após a exposição e a recuperação foi, provavelmente, devido à mobilização dessa molécula de outros tecidos visando proteger o cérebro de danos oxidativos. Segundo Rebec e Pierce (1994), o cérebro acumula ascorbato fornecido pelo sangue, o qual recebe esse antioxidante dos rins e glândulas adrenais. Outra possibilidade a ser discutida é a expressão de L-gulonolactona na espécie em estudo sob condições de restrição alimentar. Ainda, as taxas de excreção de ascorbato poderiam variar sob diferentes condições nutricionais, tal como é sabido variarem as taxas de absorção de vitamina C inversamente aos teores ingeridos (MELETHIL et al., 1986; GRAUMLICH et al., 1997). Esses fatores somados, se de fato ocorrerem, poderão ser responsáveis pela manutenção, ou mesmo aumento, dos níveis de ácido ascórbico no sistema nervoso central, mesmo sob condições de restrição alimentar.

O cérebro é alvo de estresse oxidativo, dados a alta taxa de atividades metabólicas oxidativas e o alto índice de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas, (PÉREZ-CAMPOS et al., 1983; HAI et al., 1997; FETOUI et al., 2008). Algumas espécies de peixes apresentam aumento nos níveis de ácido ascórbico quando expostos a xenobióticos, tal como observado em cérebro de *B. amazonicus* exposto ao fenol (AVILEZ, 2008) e à cipermetrina (MORAES, 2013a); em rim e fígado de *C. punctatus* exposto à deltametrina (SAYEED et al., 2003) e em cérebro e fígado de *Pseudoplatystoma* sp exposto ao glifosato (SINHORIN et al., 2014).

A despeito da manutenção da atividade da AChE em cérebro de matrinxã frente à exposição à LCH, o aumento dos níveis de ácido ascórbico evidencia a capacidade deste composto causar desequilíbrios nas defesas antioxidantes cerebrais; e a manutenção desses níveis elevados após a recuperação sugere que o organismo não foi capaz de restabelecer a enantioestasia desse órgão mesmo com a retirada do xenobiótico do ambiente, o que pode levar a efeitos adversos em longo prazo.

Em fígado de matrinxã, os níveis de ácido ascórbico responderam de maneira diferente àquela do cérebro frente à exposição à LCH; tais níveis não mostraram alteração tanto após o período de exposição como após a recuperação. *C. gariepinus* e *B. amazonicus* apresentam queda nos níveis de ácido ascórbico hepático após exposição à deltametrina (DATTA; KAVIRAJ, 2003, CORTELLA, 2010), ao passo que *C. punctatus* apresenta aumento desses níveis quando exposto ao mesmo piretroide (SAYEED et al., 2003). Já *B. amazonicus* exposto à cipermetrina não apresenta modificações nos níveis hepáticos desta molécula (MORAES, 2013a).

De acordo com o observado nas atividades enzimáticas antioxidantes hepáticas, essas defesas foram ativadas e esgotadas; provável razão para que os níveis de ácido ascórbico hepático tenham se mantido inalterados. O fígado, embora não seja o primeiro órgão de contato com o xenobiótico, é o principal envolvido na metabolização e desintoxicação desses compostos. Assim, para evitar prejuízo nessas

funções, a resposta hepática ao estressor dever ser rápida e adequada. Dessa forma, provavelmente, as enzimas antioxidantes e a glutathiona reduzida foram suficientes para atuar no metabolismo hepático, não sendo necessário o recrutamento de ácido ascórbico para esse fim. Segundo Sayeed e colaboradores (2003), dada a divergência de respostas observadas, os níveis de ácido ascórbico são pouco confiáveis em relação à sua utilização para biomonitoramento.

As glutathiona peroxidases (GPx) são uma família de enzimas que atua na remoção de  $H_2O_2$ , reação que acontece acoplando sua redução à água às custas da oxidação de glutathiona reduzida (GSH) (HALLIWELL, 2006). A GSH, um tripeptídeo que contém um grupo tiol, é também co-fator da enzima glutathiona-S-transferase (GST); uma enzima de biotransformação de fase II. Além disso, a GSH pertence ao grupo dos antioxidantes de baixo peso molecular (juntamente com o ácido ascórbico, os retinóis, carotenoides e tocoferóis) e pode reduzir diretamente as ERO ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ) através de seu grupo tiol (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011). Uma das formas de indução de estresse oxidativo por pesticidas é o decréscimo na concentração de agentes redutores, tais como a glutathiona, cuja metabolização reduz o potencial antioxidante do organismo (LUSHCHAK, 2011).

O aumento dos níveis hepáticos de GSH em matrinxã exposto à LCH, possivelmente oriundo dos mecanismos de desintoxicação ativados pelo piretroide, evidencia a capacidade de resposta desse órgão ao estresse oxidativo. Em vista da permanência dos níveis de ácido ascórbico hepáticos após os dois períodos de avaliação, supomos que este sistema secundário de defesa antioxidante não tenha sido ativado devido à atuação da GSH no exercício dessa função protetora, a qual permanece após a recuperação. Tilápia (*O. niloticus*) exposta à LCH também apresenta níveis aumentados de GSH hepática (PINER; ÜNER, 2012), assim como *C. punctatus* e *Carassius auratus gibelio* expostos à deltametrina (SAYEED et al., 2003; DINU et al., 2010). Entretanto, *P. mesopotamicus* e *C. carpio* expostos à deltametrina, e *B. amazonicus* exposto à cipermetrina, apresentam diminuição nas concentrações

hepáticas desse antioxidante (ROSSI, 2013; YONAR; SAKIN, 2011; MORAES, 2013a). Embora haja uma divergência nos relatos da literatura acerca dos níveis de GSH em fígado de peixes expostos à piretroides, esse antioxidante desempenha papel fundamental na proteção deste órgão quando há aumento das ERO, além de estar envolvido na atuação de enzimas antioxidantes específicas.

As enzimas do sistema de defesa antioxidante são essenciais à manutenção do equilíbrio redox do organismo. As superóxido dismutases (SOD) retiram o radical  $O_2^{\bullet}$  através de reações de dismutação, gerando  $H_2O_2$  e  $O_2$ . No entanto, o  $H_2O_2$  também é prejudicial às células, visto poder levar à produção de  $HO^{\bullet}$  via reação de Haber-Weiss. Assim, a catalase (CAT) atua em conjunto com a SOD transformando o peróxido de hidrogênio em  $H_2O$  e  $O_2$ . A GPx também exerce a função de remoção do  $H_2O_2$ , pois reduz os peróxidos orgânicos transformando-os em água e seus álcoois correspondentes. A conjugação de metabólicos eletrofílicos de xenobióticos com a glutathiona reduzida é a principal via de desintoxicação de drogas e carcinogênicos (GILMAN, 1996), e a GST é a enzima responsável por catalisar essa reação de conjugação. A GST, além de ser uma enzima de biotransformação, também confere proteção antioxidante ao organismo. O aumento da atividade desta enzima está associado a respostas adaptativas de defesa do organismo contra a presença de uma grande variedade de compostos orgânicos no ambiente aquático (OOST et al., 2003). A atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) também pode ser útil na avaliação do *status* redox do organismo, posto que ela está indiretamente envolvida na remoção de  $H_2O_2$  e outros peróxidos orgânicos, atuando na formação de NADPH necessário à reciclagem de moléculas oxidadas de glutathiona através da atividade da glutathiona redutase (KELLY et al., 1998; LUSHCHACK, 2011; REGOLI et al., 2011).

Embora os organismos apresentem várias formas de defesa contra as ERO, estas proteções não são 100% eficientes; dessa forma, os tecidos estão sujeitos às ações desses radicais. Quando um radical modifica a configuração dos elétrons de uma molécula que não é um radical, esta se transforma em um radical. Uma das

características das reações de radicais livres com não-radicais é que elas ocorrem em cadeia: um radical gera outro (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). A peroxidação lipídica, a qual é o estágio final do dano oxidativo, é a reação em cadeia dos radicais livres de maior relevância biológica. O malondialdeído, produto da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico; dessa forma, a quantificação das espécie reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é uma forma de se medir a taxa de peroxidação lipídica em tecidos.

A principal resposta observada em fígado de matrinxã resultante da exposição à LCH caracterizou-se por uma inibição generalizada do sistema antioxidante enzimático, concomitante ao aumento de TBARS, indicativo de peroxidação lipídica. Observando-se a diminuição na atividade da SOD, CAT e GPx, o seguinte mecanismo é proposto: altas quantidades do radical  $O_2^{\bullet}$  presentes no fígado, oriundos dos mecanismos de desintoxicação, causaram um esgotamento da SOD ou sua inativação. Dado que a SOD é responsável pela transformação desse radical em  $H_2O_2$ , substrato tanto da CAT quanto da GPx, essas enzimas não foram ativadas visto a falta de substrato. Além disso, o  $O_2^{\bullet}$  é capaz de inibir a atividade da CAT dependente de manganês (KONO; FRIDOVICH, 1983). Dada a atividade da GPx capaz de reduzir os hidroperóxidos de lipídeos e prevenir a propagação das reações em cadeia que levam à peroxidação lipídica (DI GIULIO, 1989), sua inibição pode ter contribuído para o aumento de TBARS. Esse quadro, associado ao aumento da GSH, indica uma situação de estresse oxidativo. No entanto, a GST não se mostrou sensível à intoxicação por LCH, visto que sua atividade não apresentou mudanças significativas; o que pode ter contribuído para a biodisponibilidade do xenobiótico, levando à peroxidação lipídica. O período de exposição pode não ter sido relevante quanto à inibição ou indução da GST; outrossim, sugere-se que esta enzima não seja imprescindível à biotransformação da LCH em matrinxã. Segundo Vontas e colaboradores (2002), a GST não atua na desintoxicação de piretroides; no entanto,

Gowland e colaboradores (2002) afirmam que essa enzima atua no metabolismo da cipermetrina em artrópodes terrestres e em *Carcinus maenas*, um caranguejo marinho.

Após a recuperação, a atividade de CAT hepática foi restabelecida, ao passo que a atividade de SOD continuou diminuída. A restauração da atividade de CAT chama atenção para o fato de que a diminuição da atividade de SOD na recuperação (19%) é bem menor do que a observada após a exposição (37%). Assim, é possível inferir que há substrato para a atividade tanto de CAT como de GPx, que apresenta grande aumento na atividade após a recuperação. A indução na atividade da GPx, concomitante à permanência de níveis elevados de GSH, podem ter sido responsáveis por proteger o tecido hepático contra a peroxidação lipídica. Essas observações, associadas à não observância de diferenças significativas na formação de TBARS, torna plausível a hipótese de uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo e evidencia a recuperação dos animais. A manutenção dos níveis de G6PDH em ambos os períodos de avaliação sugere que não houve depleção ou ativação desta atividade enzimática e não houve prejuízo ao fornecimento de NADPH para a maquinaria celular.

A diminuição nas atividades de SOD e CAT e o aumento nos níveis de GSH e peroxidação lipídica também foram observados em fígado de *Carassius auratus gibelio* exposto à deltametrina (DINU et al. 2010). No entanto, esta espécie apresenta aumento nas atividades de GST e GPx. Larvas de *C. carpio* expostas à gamaciotrina não apresentaram peroxidação lipídica, sendo que há diminuição na atividade da GPx e aumento na atividade da GST (RICHTEROVÁ et al., 2014). Em fígado de *O. niloticus* exposta à LCH, observa-se aumento na GSH, nos TBARS e na atividade da GST (PINER; ÜNER, 2012). Em *C. carpio* exposta à deltametrina, não há alterações na atividade da GST hepática após 4 e 15 dias de exposição; porém, após 30 dias, há indução na atividade desta enzima (ENSIBI et al., 2014).

Em peixes, o rim excreta produtos nitrogenados do metabolismo tais como amônia, ureia e creatinina (CENGIZ, 2006), desempenhando assim um importante

papel relacionado ao balanço hídrico e eletrolítico, além da manutenção de um ambiente interno estável. As respostas do metabolismo antioxidante observadas em rim de matrinxã exposto a LCH são indicativas da presença de ERO; a inibição da CAT pode ser devida a uma grande quantidade de  $O_2^{\bullet}$  neste órgão. É possível que a SOD atue de forma a fornecer  $H_2O_2$  para a GPx, porém essa atuação não é suficiente para dismutar todo o  $O_2^{\bullet}$  presente, o que acaba por inibir a CAT. Outra hipótese é que o pesticida inative diretamente as enzimas antioxidantes, o que levaria a um decréscimo do potencial antioxidante (LUSHCHAK, 2011). Quando há uma inibição na atividade da CAT, o organismo passa a depender da GPx para a remoção de  $H_2O_2$  (REGOLI et al., 2011), o que explicaria a indução da atividade da GPx. No entanto, somente a indução da atividade desta enzima não foi suficiente para poupar o órgão da ocorrência de peroxidação lipídica, visto o aumento de TBARS no rim após a exposição. Como será discutido na seção 5.2.5, os danos se estendem à morfologia do órgão, e o tecido renal foi o que apresentou injúrias mais severas em decorrência da intoxicação por LCH. Além disso, visto as desordens iônicas, é possível inferir que não houve uma resposta adequada deste órgão ao piretroide, o que levou a prejuízos funcionais.

Após a recuperação, observou-se aumento na atividade da CAT e redução da atividade da G6PDH, indicando que, embora estejam exibindo respostas adaptativas ao estresse oxidativo, ainda há ERO presentes e a enantiosíntese não foi restabelecida. No entanto, já não houve mais formação de TBARS, corroborando a hipótese de adaptação em resposta à este tipo de estresse. As atividades das enzimas antioxidantes renais do presente estudo concordam com aquelas apresentadas para *C. punctatus* exposto à deltametrina (SAYEED et al., 2003) e para *C. batrachus* exposto à alfametrina (TRIPATHI; BANDOONI, 2011); ao passo que *C. carpio* e *O. niloticus* também exibem peroxidação lipídica renal após exposição à cipermetrina (ÜNER et al., 2001). Em *C. punctatus* expostos à LCH, a taxa de peroxidação lipídica

renal é maior do que a hepática (KUMAR; SHARMA; PANDEY, 2012b), dados estes similares os observados no presente estudo.

As brânquias dos peixes ficam em contato imediato com o meio ambiente, e a alta lipofilicidade dos piretroides aumenta sua absorção pelas brânquias quando o ambiente aquático está contaminado (MISHRA et al., 2005). Assim, esse órgão é altamente sensível à peroxidação lipídica induzida por xenobióticos, e seu potencial antioxidante é fraco em relação aos demais órgãos (SAYEED et al., 2003). A única alteração observada em brânquias de matrinxã exposto à LCH, no que tange às atividades enzimáticas, foi a diminuição na atividade da enzima G6PDH, a despeito da manutenção das atividades de GPx e CAT. Como a G6PDH atua na reciclagem de moléculas oxidadas de glutathione, seria esperado que uma inibição de sua atividade levasse a um desequilíbrio nas atividades enzimáticas dependentes de glutathione. De acordo com Lushchak (2011), os pesticidas podem interferir em processos de produção de energia, o que pode também explicar a inibição da G6PDH. As enzimas antioxidantes branquiais não foram responsivas pela provável presença de ERO nesse tecido, o que resultou em peroxidação lipídica do mesmo, dado o aumento observado nos TBARS.

Após a recuperação, a atividade da CAT aumentou, o que sugere uma ativação tardia das defesas antioxidantes. Essa indução na atividade da CAT pode ser entendida como uma adaptação ao estresse oxidativo que, embora menos evidente que o observado em fígado, também ocorre nas brânquias. Ademais, ainda é observada uma diminuição na atividade da G6PDH após a exposição, embora não seja estatisticamente diferente do grupo controle. A ação da CAT preveniu a formação de reação em cadeia que leva à peroxidação lipídica das brânquias, assim como ocorre no tecido renal, daí não serem observados TBARS após o período de recuperação.

A atividade de CAT e de GPx branquiais em *C. punctatus* exposto à deltametrina diminuem (SAYEED et al., 2003), assim como a atividade branquial de

CAT e SOD em *Labeo rohita* expostos ao fenvalerato (PRUSTY et al. 2011) e em matrinxã exposto à cipermetrina (MORAES, 2013a). *C. punctatus* e *C. gariepinus* expostos à deltametrina apresentam peroxidação lipídica branquial (KAUR et al., 2011; AMIN; HASHEM, 2012). Segundo Rigoli e colaboradores (2011), as brânquias não são muito responsivas ao metabolismo antioxidante, o que sugere que esse órgão seja mais útil na avaliação imediata da exposição do que dos efeitos posteriores causados por ela.

### **6.2.5. Análises histopatológicas**

#### ***Fígado***

O fígado dos peixes é um órgão denso, localizado ventralmente na região cranial da cavidade celomática. Este órgão é uma importante glândula digestória, no qual a veia porta é dividida em capilares sinusoides, de calibre mais grosso que os capilares normais. As células parenquimais são arranjadas concentricamente ao redor destes vasos, os quais são o centro do arranjo cordonal característico do fígado (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). O principal tipo celular hepático é o hepatócito parenquimal, enquanto que células endoteliais, lipócitos, células de Kupffer, células mesoteliais e fibroblastos completam a estrutura hepática (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

O fígado de matrinxãs não expostos (controles) apresentou, no parênquima hepático, fibras de tecido conjuntivo que sustentam os hepatócitos organizados em um arranjo cordonal ao longo dos capilares sinusóides. Os hepatócitos apresentaram forma hexagonal, levemente arredondada, com núcleo central (Figura 27A, B, C e D).

O fígado é o principal local de metabolização e desintoxicação de xenobióticos, para posterior excreção dessas substâncias. Este órgão é altamente plástico, podendo se adaptar a uma ampla variedade de situações; no entanto, caso a concentração de xenobióticos seja prejudicial, estes mecanismos de regulação podem ser afetados levando a danos estruturais (KAN et al., 2012). As alterações mais frequentes

encontradas no fígado dos peixes expostos à LCH (aumento da frequência de vasos, deformação do contorno celular, desarranjo dos cordões hepáticos, vacuolização citoplasmática, grânulos eosinófilos, degeneração nuclear e citoplasmática e acúmulo de lipídeos; Figura 27E) e de peixes recuperados (hipertrofia e atrofia nuclear e celular, deformação do contorno celular, desarranjo dos cordões hepáticos, vacuolização citoplasmática, grânulos eosinófilos, vacuolização nuclear e degeneração nuclear e citoplasmática; Figura 27F) indicaram que este xenobiótico atua de maneira prejudicial a este órgão.

O aumento na quantidade de vasos sanguíneos hepáticos sugere um aumento no fluxo sanguíneo do órgão; adaptação que facilitaria a eliminação dos resíduos produzidos pelo metabolismo hepático da LCH seguida de posterior excreção pelo rim e brânquias. A vacuolização citoplasmática é associada à inibição da síntese proteica, depleção das reservas energéticas, desagregação dos microtúbulos ou trocas na preferência de utilização de substratos (HINTON; LAURÉN, 1990). A degeneração citoplasmática e celular, embora sejam reversíveis, são consideradas lesões mais graves e podem prejudicar as funções hepáticas, dado que a área metabolicamente ativa do órgão é diminuída (MADUENHO; MARTINEZ, 2008). Segundo Takashima e Hybia (1995) a hipertrofia pode ser considerada uma resposta ao estresse que não compromete as funções normais do órgão.

O peixe *Catla catla* apresenta vacuolização e degeneração citoplasmática, ruptura dos vasos sanguíneos e necrose hepáticas após a exposição à alfa-cipermetrina (MUTHUVIVEGANANANDAVEL et al., 2013). As avaliações histopatológicas de fígado de *O. niloticus* após exposição ao mesmo piretroide são hipertrofia de hepatócitos, núcleos picnóticos, necrose, degeneração vacuolar, estreitamento dos sinusoides, congestão e degeneração lipídica (KORKMAZ et al., 2009). O fígado de *C. carpio* apresenta degeneração hidrópica decorrente da exposição à ciflutrina (SEPICI-DINÇEL et al., 2009). O bagre *C. gariepinus* exposto à cipermetrina exhibe degeneração citoplasmática, vacúolos lipídicos, núcleos picnóticos

e necrose focal hepáticos (VELMURUGAN; MATHEWS; CENGIZ, 2009). De acordo com esses autores, dez dias de recuperação em água limpa não são suficientes para o restabelecimento da morfologia normal do órgão, tal como observado no presente estudo.

Embora as alterações hepáticas decorrentes da exposição à LCH possam alterar o funcionamento regular deste órgão, estas foram classificadas entre moderadas a severas, o que sugere que possam ser revertidas e o fígado possa voltar ao funcionamento normal. No entanto, o período de recuperação avaliado neste estudo não foi o suficiente para a reversão dessas alterações, dada a permanência de modificações hepáticas após sete dias em água limpa. As alterações histopatológicas associadas às respostas do metabolismo antioxidante sugerem que a intoxicação por LCH foi hepatotóxica e, mesmo com os níveis elevados de GPx e GSH após a recuperação, os sete dias não foram suficientes para o restabelecimento estrutural do órgão. Entretanto, apenas após a exposição houve peroxidação lipídica, o que indica possível recuperação hepática após um período maior em água livre do xenobiótico. Considerando-se as alterações observadas em outros teleósteos expostos a piretroides e as observadas neste estudo, conclui-se que não são específicas mas sim mudanças associadas à resposta hepática à presença de xenobióticos.

### **Rim**

O rim dos peixes teleósteos consiste em unidade anterior e uma posterior: o rim anterior é formado por tecido linfoide, enquanto que o posterior é composto pelos néfrons e tecido linfoide intersticial. A função principal do rim posterior nos teleósteos é a excreção da grande quantidade de água que entra no organismo através das brânquias, enquanto que o rim posterior forma o tecido hematopoiético desses animais (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). O rim dos peixes não expostos à LCH apresentou-se organizado em túbulo contorcido proximal, túbulo contorcido distal e corpúsculo renal. O corpúsculo renal é composto pelo glomérulo e pela cápsula renal, distribuídos ao

longo do tecido; sendo que os glomérulos são agrupamentos lobulados de capilares. Os túbulos contorcidos proximais são alongados e as suas células de revestimento são cúbicas ou colunares com microvilosidades, formando borda em escova. Os túbulos contorcidos distais são circulares e suas células de revestimento são cúbicas com microvilosidades (Figuras 28A e B). Entre as estruturas renais encontra-se tecido hematopoiético.

O rim recebe a maior parte do sangue pós-branquial, e lesões nesse órgão são bons bioindicadores. Os quadros histopatológicos mais comuns no rim dos peixes expostos à LCH foram hipertrofia celular, vacuolização celular, degeneração granular e hialina, oclusão da luz tubular, redução do espaço de Bowman e presença de hemácias no espaço de Bowman (Figura 28C). Após a recuperação, essas lesões permaneceram, entretanto foi observado aumento no espaço de Bowman e hemorragia (Figura 28D). De acordo com Takashima e Hibiya (1995), a exposição a metais pesados ou agroquímicos pode afetar indiretamente o tecido renal, levando a anomalias metabólicas. Além disso, as degenerações granulares e hialinas são mudanças reversíveis promovidas por uma sobrecarga nas funções do órgão. A degeneração granular e hialina, caracterizada por grânulos eosinófilos no interior das células formados pela reabsorção de proteínas plasmáticas perdidas na urina, são indicativas de danos corpusculares (HINTON; LAURÉN, 1990; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995) e podem, em casos mais severos, levar à necrose. O tempo de exposição à LCH neste estudo não foi suficiente para que houvesse o estabelecimento de necrose no tecido renal, porém, o tempo de recuperação não foi suficiente ao reestabelecimento estrutural do órgão.

Em rim de *C. carpio* a exposição à deltametrina causa degeneração do epitélio celular dos túbulos renais, presença de núcleos picnóticos no tecido hematopoiético, dilatação dos capilares do glomérulo, degeneração glomerular, vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais dos túbulos renais com hipertrofia celular e oclusão da luz tubular (CENGIZ et al., 2006). O teleósteo *C. mrigala* exposto à LCH

apresenta necrose do epitélio tubular, degeneração granular das células epiteliais dos túbulos renais, oclusão da luz tubular, contração do glomérulo e expansão do espaço da cápsula de Bowman (VELMURUGAN et al., 2007). Em rim de *L. rohita* exposta ao fenvalerato, observa-se descolamento das células epiteliais e severa degradação glomerular (MOHAPATRA et al., 2012). Porém, truta arco-íris (*O. mykiss*) exposta à cipermetrina não apresenta modificações histopatológicas renais (VELISEK et al., 2006); ao passo que o rim de *C. auratus gibelio* é o órgão mais afetado pela exposição à deltametrina (STAIKU et al., 2007).

O IAH dos matrinxãs expostos à LCH indica que houve alterações severas no rim. As alterações encontradas nos peixes não expostos apontam para lesões de moderadas a severas. Esse fato pode ter sido devido às 96 horas em que todos os peixes permaneceram em sistema fechado, sem recirculação de água. Isso ocasionaria um aumento na amônia do meio, aumentando a dificuldade de excreção dos compostos nitrogenados com possíveis efeitos no rim. É importante ressaltar ainda que essas alterações são reversíveis. As observações no metabolismo antioxidante e a ocorrência de peroxidação lipídica, somadas às alterações iônicas e histopatológicas renais oriundas da exposição de *B. amazonicus* à LCH, permitem inferir que este piretroide exerce grande toxicidade no sistema excretor desta espécie, com prejuízo da função renal.

### **Brânquias**

Como ressaltado anteriormente, as brânquias de teleósteos são o principal local de trocas gasosas, de regulação hidromineral e de excreção nitrogenada, sendo que em peixes de água doce, esse órgão atua na absorção de sais ao passo que em peixes marinhos, atuam excretando sais. Além disso, as brânquias são especialmente vulneráveis a contaminantes aquáticos, incluindo pesticidas, visto estarem em contato direto com a água (BABU et al., 2014). As brânquias de matrinxã apresentam-se organizadas em quatro arcos de onde se formam os filamentos e as lamelas

secundárias. As lamelas primárias consistem de suporte cartilaginoso, sistema vascular e epitélio multiestratificado. O epitélio lamelar primário é constituído de células pavimentosas; o epitélio lamelar secundário constitui-se de uma camada dupla de células epiteliais. A camada externa é denominada respiratória, enquanto a camada interna a sustenta. O epitélio lamelar primário contém células mucosas e cloreto (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

Os animais não expostos apresentaram hipertrofia e hiperplasia do epitélio das lamelas, descolamento epitelial, proliferação de células cloreto, congestão, edema, e aneurisma; as brânquias dos peixes expostos apresentaram as mesmas alterações, somadas à proliferação de células mucosas e hemorragia; no entanto, a maioria das injúrias observadas no grupo exposto ocorreu em maior intensidade. Após o período da recuperação, os peixes não expostos e os expostos e recuperados apresentaram hipertrofia e hiperplasia dos epitélios das lamelas, fusão lamelar e proliferação de células cloreto; contudo tais alterações foram mais evidentes nos animais recuperados. Além disso, estes peixes apresentaram proliferação das células mucosas. As modificações observadas podem ser interpretadas como defesas à presença do xenobiótico, visto que a hiperplasia e a hipertrofia epiteliais, fusão lamelar e proliferação de células mucosas aumentam a distância de difusão do pesticida até os capilares. Contudo, ao aumentar essa barreira, a difusão de oxigênio também é prejudicada, o que corrobora os dados hematológicos obtidos neste estudo. Interessante notar que as brânquias dos animais expostos e recuperados não apresentaram injúrias mais severas do que as dos grupos controle. Visto que, como relatado anteriormente, esses órgãos estão em contato direto com o meio aquático, esperar-se-ia que tivessem prejuízos morfológicos e, conseqüentemente, funcionais. No entanto, os pesticidas passam rapidamente através das brânquias e contaminam outros órgãos através da corrente sanguínea (BABU et al., 2014). Uma hipótese plausível para explicar esses resultados é a de que a concentração e/ou o tempo de exposição não foram suficientes para causar danos severos às brânquias, em

detrimento das injúrias causadas em fígado e, principalmente, em rim, oriundas da intoxicação por LCH. Mudanças no epitélio branquial, hipersecreção e proliferação de células mucosas, modificações nas células cloreto e na vascularidade branquiais são altamente inespecíficas, dado que são observadas em resposta a uma grande variedade de condições de exposição (MALLATT, 1985).

Outros teleósteos quando expostos a piretroides apresentam alterações branquiais similares às descritas neste estudo além de outras mais pronunciadas, tais como: *Anabas testudineus* e *C. gariepinus* expostos à cipermetrina (BABU et al. 2014; VELMURUGAN; MATHEWS; CENGIZ, 2009), *Pangasius hypophthalmus* expostos à deltametrina (HEDAYATI; TARKHANI, 2013) e *Lebistes reticulatus* expostos à zeta-cipermetrina (ÇALISKAN; ERKMEN, YERLI, 2003). A exposição de *C. mrigala* à 0,3 e 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  de LCH leva a aneurisma, necrose, levantamento e hiperplasia epiteliais, descamação, edema, encurtamento da lamela secundária e fusão lamelar branquial (VELMURUGAN et al., 2007). Apesar da baixa concentração utilizada no referido estudo, os peixes foram expostos por dez dias, o que pode ter contribuído para a severidade das lesões.

#### **6.2.6. Teste do micronúcleo (MN) e alterações nucleares eritrocitárias (ANE)**

A importância do estudo dos efeitos genotóxicos causados por xenobióticos em peixes de água doce reside na importância deste parâmetro para a ecologia e sobrevivência da população. A atividade clastogênica de um pesticida pode levar a doenças genéticas, teratogênese e carcinogênese em populações de peixes de água doce. Contudo, os testes de efeitos clastogênicos utilizados para avaliação de mamíferos apresentam problemas técnicos em peixes. Dessa forma, a avaliação da formação de micronúcleos e alterações nucleares eritrocitárias tornou-se um método bastante utilizado para a observação de tais consequências nos peixes (AL-SABTI; METCALFE, 1995). A contagem de MN é um índice de quebras cromossômicas e

disfunções do fuso mitótico, ao passo que as ANE são um sinal de danos citogenéticos em peixes (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000).

Não houve diferenças significativas na formação de MN e ANE em *B. amazonicus* exposto à LCH e ou recuperados. É possível inferir que o tempo de avaliação do presente estudo não foi adequado à estimativa do potencial genotóxico deste piretroide para o matrinxã, dado que Çavas e Ergene-Gözükara (2003) afirmam que, na maioria dos estudos, a formação de MN e ANE ocorre entre 24 e 48 horas de exposição. Ademais, a concentração de LCH utilizada pode ter causado modificações na cinética de renovação dos eritrócitos de *B. amazonicus*, sendo que, no momento da avaliação, as células danificadas já haviam sido eliminadas e substituídas por outras que não apresentavam injúrias. Há poucos relatos acerca da taxa de renovação eritrocitária em teleósteos, porém Campana e colaboradores (1999), ao estudarem a frequência de MN em *Cheirodon interruptus interruptus* expostos à LCH, admitem que altas concentrações deste piretroide podem causar modificações no ciclo de reposição eritrocitária.

O peixe *Gambusia affinis* exposto à LCH por até 48 horas apresenta alta frequência de MN e ANE (MURANLI; GÜNER, 2011); *Garra rufa* exposto ao mesmo piretroide, apresenta formações significativas de MN e ANE após 36 horas de exposição (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003). O número de cromossomos acêntricos e quebras de cromátide encontradas em *Mystus gulio* exposto à LCH é significativamente maior após 72 horas de exposição (VELMURUGAN; AMBROSE; SELVANAYAGAM, 2006).

---

## 7. CONCLUSÕES

---

De acordo com o exposto, conclui-se que:

- a. O piretroide LCH, na formulação Trinca-Caps<sup>®</sup>, é considerado altamente tóxico ao *B. amazonicus*, visto que a CL 50;96h é menor que 1 mg L<sup>-1</sup> (IBAMA, 2012).
- b. A exposição à 0,65 µg L<sup>-1</sup> de LCH causa alterações hematológicas e iônicas em *B. amazonicus*, não restabelecidas após 7 dias de recuperação em água livre do xenobiótico.
- c. A LCH não interfere na atividade da AChE cerebral de *B. amazonicus*, embora esse tecido apresente elevados níveis de ácido ascórbico, com possível papel protetor contra o estresse oxidativo causado pelo piretroide.
- d. Fígado, rim e brânquias de *B. amazonicus* apresentam estresse oxidativo oriundo da exposição à LCH, sendo que o fígado é o órgão que apresenta respostas mais pronunciadas em relação à atividade das enzimas antioxidantes e dos antioxidantes não enzimáticos. A enantioestasia dos três tecidos não foi restabelecida após 7 dias de recuperação.
- e. Fígado, rim e brânquias de *B. amazonicus* apresentam peroxidação lipídica após 96 horas de exposição à LCH. O tecido renal foi o mais afetado em relação a esse parâmetro. Sete dias de recuperação foram suficientes para que não fosse mais observada a ocorrência de peroxidação lipídica nos três tecidos avaliados.
- f. Fígado e rim de *B. amazonicus* apresentam alterações morfológicas decorrentes da exposição à LCH, ao passo que as brânquias permanecem sem alterações. Tais alterações não são recuperáveis após 7 dias de recuperação.
- g. Não foram observadas formações significativas de micronúcleos e alterações nucleares eritrocitárias em *B. amazonicus* resultantes da exposição à LCH por 96 horas.

As análises realizadas neste trabalho evidenciam o potencial hepatotóxico e nefrotóxico decorrentes da exposição à LCH em *B. amazonicus*. Considerando-se a baixa dosagem utilizada neste estudo, estes dados ressaltam a importância do uso consciente deste pesticida, assim como legislações adequadas para utilização do mesmo, posto que as modificações observadas podem promover prejuízos às populações de *B. amazonicus* e seu sucesso em atividades de criação.

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 15088**: ecotoxicidade aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2006. 19p.

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). **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 58, n.2, p. 220-226, 2004.

AFFONSO, E.G. et al. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulphide or hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, v. 133, p. 375-382, 2002.

AHMAD, M.K. et al. Comparative study of synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin and Neem based pesticide Neemgold on the fingerlings of zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). **Res. J. Chem. Sci.**, v.1 n.6, p. 91-94, 2011.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mut. Res.**, v.343, p. 121-135, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (ANVISA). **Consulta Pública nº 64, de 11 de Julho de 2007**. 2007a. Disponível em <<http://www4.ANVISA.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B19072-1-0%5D.PDF>>. Acesso em 29/09/2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (ANVISA). **Consulta pública nº 16, de 13 de fevereiro de 2007**. 2007b. Disponível em <[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[17566-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[17566-1-0].PDF)>. Acesso em 29/09/2014.

\_\_\_\_\_. (ANVISA). **Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012**. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>> Acesso em abril/2014.

\_\_\_\_\_. (ANVISA). **Resolução – RE n. 711, de 28 de Fevereiro de 2013. Diário Oficial da União. 01 de Março de 2013, seção 1 – p. 88**. 2013a. Disponível em: <[ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe\\_eletronico/2013/iels.mar.13/iels40/U\\_RS-MS-ANVISA-RE-711\\_280213.pdf](ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2013/iels.mar.13/iels40/U_RS-MS-ANVISA-RE-711_280213.pdf)>. Acesso em 29/09/2014.

\_\_\_\_\_. (ANVISA). **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. 2013b. Disponível em <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/z>> Acesso em 14/10/2013.

AMIN, K.A.; HASHEM, K.S. Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. **BMC Vet. Res.** v. 8, n.45, 2012. doi:10.1186/1746-6148-8-45.

ANADÓN, A.; MARÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTÍNEZ, M.A. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. **Vet. J.** v.182, p. 7-20, 2009.

ANSARI, R.A. et al. Genotoxic and oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of a freshwater biomarker fish species, *Channa punctata* bloch. **Environ. Toxicol.**, v.24, p. 429-436, 2009.

APHA. **Standard methods for examination of water and wastes**. 12. ed. Washington, DC: Join Editorial Board, 1980.

- ASSIS, H.C.S. et al. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis*. **Braz. arch. biol. tech.**, v.6, p. 1401-1407, 2009.
- AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review **Mar. Poll. Bull.**, v.48, p. 817-834, 2004.
- AVILEZ, I.M. et al. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, v. 139, n. 1-3, p. 135-139, 2004.
- AVILEZ, I.M. **Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, SPIX & AGASSIZ, 1829, Characidae) exposto ao fenol**. 2008. 155f.Tese (Doutorado Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mut. Res.**, v. 467, p. 177-186, 2000.
- BABU, V., et al. Surface structures of gill, scale and erythrocyte of *Anabas testudineus* exposed to sublethal concentration of cypermethrin. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.37, p. 1109-1115, 2014.
- BACCHETTA, C., et al. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. **Ecolog. Ind.**, v.36, p. 532-538, 2014.
- BADIOU, A.; BELZUNCES, L.P. Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. **Chem.-Biol. Interact.**, 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. **Agric. Water Manag.**, v.106, p.42-49, 2012.
- BÁLINT, T., et al. Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.37, p. 17-23, 1997.
- BARTON, B.A. Stress in fish: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ. Comp. Biol.**, n. 42, p.517-525, 2002.
- BHATTACHARYA, M.D.; KAVIRAJ, A. Toxicity of the pyrethroid pesticide fenvalerate to freshwater catfish *Clarias gariepinus*: lethality, biochemical effects and role of dietary ascorbic acid. **J. Environ. Sci. Health Part B**, v. 44, p. 578-583, 2009.
- BEGUM, G. Organ-specific ATPase and phosphorylase enzyme activities in a food fish exposed to a carbamate insecticide and recovery response. **Fish Physiol. Biochem.**, v.37, p. 61-69, 2011.
- BELLUTA, I., et al. Avaliação temporal e espacial no Córrego do Cintra (Botucatu – SP) frente ao defensivos agrícolas e parâmetros físico-químicos de qualidade da água – um estudo de caso. **Ver. Ener. Agric.**, n. 2, p. 54-73, 2010.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: manual of biochemical methods**. 3.ed. Michigan: Grune & Stratton, INC, 1984. 187p.
- BEYERS, D.W., et al. Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish. **Can. J. Fish. Aq. Sci.**, v.56, p. 814-822, 1999.

- BONGA, S.E.W.; LOCK, R.A.C. Toxicants and osmoregulation in fish. **Nether. J. Zool.**, v. 43, n. 2-3, p. 478-493, 1992.
- BONGA, S.E.W. The stress response in fish **Physiol. Rev.**, v.37, n. 3, p. 591-625, 1997.
- 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, n. 6, p. 920-926, 2007.
- BRADBURY, S.P.; McKIM, J.M.; COATS, J.R. Physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute fenvalerate intoxication. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.27, p. 275-288, 1987.
- BRADBURY, S.P.; COATS, J.R. Comparative toxicology of pyrethroid insecticides. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 108, p. 133-177, 1989.
- 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**. Brasília, DF, 2005a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Gfoil de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS n.º 518/2004**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005b.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)>. Acesso em: 29/09/2014.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. **Relatório de produtos formulados**. 2014. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 10/08/2014.
- BRECKENRIDGE, C.B., et al. Evidence for a separate mechanism of toxicity for the type I and type II pyrethroid insecticides. **NeuroTox.**, v. 30S, p. S17-S31, 2009.
- BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E. Análise Estatística. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.) **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Rima, 2006. p. 221-249.
- BURR, S.A.; RAY, D.E. Structure-activity and interaction effects on 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. **Toxicol. Sci.**, v.77, p. 341-346, 2004.
- BURRIDGE, L., et al. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v.306, p. 1-23, 2010.
- ÇALISKAN, M.; ERKMEN, B.; YERLI, S.V. The effects of zeta cypermethrin on the gills of common guppy *Lebistes reticulatus*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.14, p. 117-120, 2003.
- CAMPANA, M.A., et al. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus* **Mut. Res.**, v.438, n. 13, p. 155-161, 1999.
- CARR, R.S. et al. Comparison of methods for determination of ascorbic acid in animal tissues. **Anal. Chem.**, v.55, p. 1229-1236, 1983.
- CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.47, p.2123 -2136, 1990.

- CASIDA, J.E., et al. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.23, p. 413-438, 1983.
- CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: past, present or future? **Annu. Rev. Entomol.**, v.43, p. 1-16, 1998.
- ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells **Mut. Res.**, v. 534, p. 93-99, 2003.
- CENGİZ, E. I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, n.22, p. 200-204, 2006.
- CERQUEIRA, C.C.C.; & FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.52 p. 83-91, 2002.
- CHARLWOOD, J.D., et al. A field trial with lambda-cyhalothrin (ICON) for the intradomiciliary control of malaria transmitted by *Anopheles darlingi* root in Rondonia, Brazil. **Acta Tropica**, v.60, p. 3-13, 1995.
- CLARK, J.R., et al. Waterborne and sediment source toxicities of six organic chemicals to grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and amphioxus (*Branchiostoma caribaeum*). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.16, n. 4, p. 401-407, 1987.
- CLAUSS, T. M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic disorders of fish. **Vet. Clin. Exotic Anim. Pract.**, v.11, p. 445-462, 2008.
- COATS, J.R. Mechanisms of toxic action and structure- activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. **Environ. Health Persp.**, v. 87, p. 255-262, 1990.
- COATS, J.R. Toxicology of Synthetic Pyrethroid Insecticides in fish: a case study. In: DI GIULIO, R.T.; D.E. HINTON (Ed.). **The Toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and 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®**. 2010. 101f Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- COSTA, P.M., et al. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. **Aquat. Toxicol.**, v.92, p. 202-212, 2009.
- DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 134, n.1, p. 109-121, 2003.
- DATTA, M.; KAVIRAJ, A. Ascorbic acid supplementation of diet for reduction of deltamethrin induced stress in freshwater catfish *Clarias gariepinus*. **Chemosphere**, v.53, n. 8, p.883-888, 2003.
- DAVIES, T.G.E., et al. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB Life**, v.59, n. 3, p. 151-162, 2007.
- DEMOUNTE, J.P. A brief review of environmental fate and metabolism and pyrethroids. **Pestic. Sci.**, v.27, p. 375-385, 1989.

- DI GIULIO, R.T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.8, p. 1103-1123, 1989.
- 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.
- DINU, D., et al. Modulatory effects of deltamethrin on antioxidant defense mechanisms and lipid peroxidation in *Carassius auratus gibelio* liver and intestine **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 58, n.3, p. 757-764, 2010.
- DRABKIN, D.L. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci.**, v. 1, n. 215, p. 110-111, 1948.
- DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p.421-31, 1990.
- ELLMAN, G.L., et al. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- ELLIOTT, M. Properties and applications of pyrethroids. **Environmental Health Perspectives**, v.14, p.3-13, 1976.
- EL-SAYED, Y.S; SAAD, T.T.; EL-BAHR, S.M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.24, n.3, p. 212-217, 2007.
- EMEA. European Medicines Agency. Committee for Veterinary Medicinal Products. **Cypermethrin (Extension for Salmonidae)**. Londres, Reino Unido: The European Agency for the Evaluation of Medical Products, Veterinary Medicines and Inspections, 2003.
- ENSIBI, C., et al. 2012. Effects of carbofuran and deltamethrin on acetylcholinesterase activity in brain and muscle of the common carp. **Environ. Toxicol.**, v.29, n. 4, p. 386-393, 2014.
- ERNST, W., et al. Dispersion and toxicity to non-target aquatic organisms of pesticides used to treat sea lice on salmon in net pen enclosures. **Mar. Pollut. Bull.**, v.42, p. 433-444, 2001.
- EVANS, D.H. An emerging role for cardiac peptide hormone in fish osmoregulation. **Annu. Rev. Physiol.**, n. 52, p. 43-60, 1990.
- 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. **Physiol. Rev.**, v.85, p. 97-177, 2005.
- EVANS, D.H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, n. 295, p. R704-R713, 2008.
- FANG, J.K.H., et al. The use of physiological indices in rabbitfish *Siganus oramin* for monitoring of coastal pollution **Mar. Pollut. Bull.**, v.58, p. 1229-1235, 2009.
- FAO. Global aquaculture production volume and value statistics database updated to 2012. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture Department, March 2014. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf> . Acesso em: abril/2014.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mut. Res.**, v.455, p. 81-95, 2000.

- FETOUI, H., et al. Oxidative stress induced by lambda-cyhalothrin (LTC) in rat erythrocytes and brain: Attenuation by vitamin C. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.26, p. 225-231, 2008.
- FORSGREN, K.L.; RIAR, N.; SCHLENK, D. The effects of the pyrethroid insecticide, bifenthrin, on steroid hormone levels and gonadal development of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) under hypersaline conditions. **Gen. Comp. Endocrinol.**, n. 186, p. 101-107, 2013.
- FORSBROW, P.J.; LISTER, T.; RAY, D.E. The role of voltage-gated chloride channels in type II pyrethroid insecticide poisoning. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.163, p. 1-8, 2000.
- FRACALLOSSI, D.M., et al. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. **Aquacult.**, v.192, p. 321-332, 2001.
- FRANCO, R., et al. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mut. Res.**, v.674, p. 3-22, 2009.
- FULTON, M.H.; KEY, P.B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.20, n.1, p.37-45, 2001.
- GADHAVE, P.D., et al. Studies on acute toxicity of synthetic pyrethroid  $\lambda$ -cyhalothrin on freshwater fish *Labeo rohita*. **Vet. World**, v.7, p. 7-9, 2014.
- GAMMON, D.W.; BROWN, M.A.; CASIDA, J.E. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.15, p. 181-191, 1981.
- GEEST, J.L.V.; BURRIDGE, L.E.; KIDD, K.A. Toxicity of two pyrethroid-based anti-sea lice pesticides, AlphaMax<sup>®</sup> and Excis<sup>®</sup>, to a marine amphipod in aqueous and sediment exposures. **Aquacul.**, v.434, p. 233-240, 2014.
- GENTZKOW, C.J.; MASEN, J.M. An inaccurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Chem.**, n. 143, p. 531-544, 1942.
- GIDDINGS, J.M.; BARBER, I.; WARREN-HICKS, W. Comparative aquatic toxicity of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its resolved isomer gamma-cyhalothrin. **Ecotoxicol.**, v. 18, p. 239-249, 2009.
- GILMAN, A.G. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação de fármacos. In: GOODMAN, A.G.; GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9ed. Rio de Janeiro, RJ: McGraw Hill Interamerica, 1996. p. 3-21.
- GOULDING, A.T., et al. Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, v.157, n.3, p. 280-286, 2013.
- GOLDSTEIN, E.G.; CLYMO, R.S. **Methods for chemicals analysis of freshwater**. Oxford: IBP Handbook n.8. Blackwell Scientific Publications, 1969. 171p.
- GOWLAND, B.T.G., et al. Cypermethrin induces glutathione-S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. **Mar. Environ. Res.** n. 54, p. 169-177, 2002.
- GRAUMLICH, J., et al. Pharmacokinetic model of ascorbic acid in Humans during depletion and repletion **Pharmac. Res.**, v.14, n.9, p. 1133-1139, 1997.
- GU, B.G., et al. Risk assessment of  $\lambda$ -cyhalothrin on aquatic organisms in paddy field in China. **Reg. Toxicol. Pharmacol.** , v.48, p. 69-74, 2007.

- GUARDIOLA, F.A., et al. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish Shell. Immunol.**, v.36, p. 120-129, 2014.
- GUILHERME, S., et al. Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup and Garlon) in fish transient and reversible upon cessation of exposure? **Aquat. Toxicol.**, v.155, p. 213-221, 2014.
- GÜNER, U. Determination of lambda-cyhalotrin (Tekvando 5EC) 96 hour lethal concentration 50 at *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853). **J. Fish. Sci.**, v.3, n.3, p. 214-219, 2009.
- GUPTA, S.; HANDA, S.K.; SHARMA, K.K. A new spray reagent for the detection of synthetic pyrethroids containing a nitrile group on thin-layer plates. **Talanta**, v. 45, p. 1111-1114, 1998.
- GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v.41/42, p.1819-1828, 1995.
- HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. **Methods Enzymol.**, v.77, p. 398-405, 1981.
- HAI, D. Q.; VARGA, S.Z.I.; MATKOVICS, B. Organophosphate effects on antioxidant system on carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 117, p. 83-88, 1997.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 715S-725S, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in biology and medicine**, 3<sup>rd</sup>. ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.**, v.141, p. 312-322, 2006.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimed Spearman-Kärber method for estimating medial lethal concentrations in toxicoty bioassays. **Environ. Scien. Technol.**, v. 7, p. 714-719, 1977.
- HAMMER, C. Fatigue and exercise tests in fish **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, n. 1, p. 1-20, 1995.
- HART J.L.; et al. Novel cypermethrin formulation for the control of sea lice on salmon (*Salmo salar*). **Vet. Rec.**, v.140, p.179-181, 1997.
- HAVERIN, J.; VORNANEN, M. Effects of deltamethrin on excitability and contractility of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, v. 159, p. 1-9, 2014.
- HAYA, K. Toxicity of pyrethroid insecticide to fish. **Environ. Toxicol. Chem.**, n.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**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 2005. p. 305-340.
- HE, L., et al. Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v.195, p. 71-91, 2008.

- HEDAYATI, A.; TARKHANI, R. Hematological and gill histopathological changes in iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) exposed to sublethal diazinon and deltamethrin concentrations. **Fish Physiol. Biochem.**, v.40, n.3, p. 715-720, 2014.
- HERNÁNDEZ-MORENO, D. et al. Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. **Sci. Total Environ.**, v.408, p.4976-4983, 2010.
- HILDEBRAND, M.E., et al. Voltage-gated calcium channels are potently blocked by the pyrethroid insecticide allethrin. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v.308, p. 805-813, 2004.
- HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Integrative histopathological effects of environmental stressors in fishes. **Am. Fish. Soc. Symp.**, n.8, p. 51-66, 1990.
- HINTON, D.E.; SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Toxic responses of the liver. In: SCHLENK, D.; BENSEN, W.H. (Ed.) **Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts**. Local: Taylor & Francis, Londres, 2001. p. 224-268.
- HUGHES, G.M.; BIRÓ, P. Swimming performance of rainbow trout following exposure and recovery from the pyrethroids S-deltamethrin **Acta Biol. Hung.**, n. 44, p. 231-241, 1993.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Avaliação da toxicidade aguda para peixes \_\_\_\_\_. In: **Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, DF, 1987. Parte D. 3.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Avaliação de risco ambiental de agrotóxicos no Ibama**. Disponível em: < <http://ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-de-risco-ambiental-de-agrotoxicos-no-ibama> > .Acesso em: 30/08/2014, 2012.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em:<[ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos\\_naturais/indicadores\\_desenvolvimento\\_sustentavel/2012/ids2012.pdf](ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/indicadores_desenvolvimento_sustentavel/2012/ids2012.pdf)> Acesso em: 29/09/2014.
- INOUE, L.A.K.A.; NETO, C.S.; MORAES, G. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1896) **Ciênc. Rural**, v.33, n. 5, p. 943-947, 2003.
- JOHNSON, L.L., et al. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. **Envir. Scie. Technol.**, v. 27, p. 2759-2771, 1993.
- 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. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 34, p. 170-179, 2012.
- KAUR, M., et al. The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress response in *Channa punctatus* Bloch. **Chem-Biol. Inter.**, v. 193, p. 216-224, 2011.
- KAVIRAJ, A.; GUPTA, A. Biomarkers of type II synthetic pyrethroid pesticides in freshwater fish **Biomed Res. Intern.**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- KELLY, S.A., et al. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. **Environ. Health Persp.**, v. 106, n.7, p. 375-385, 1998.
- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Inhibition and reactivation of Mn-Catalase: implications for valence changes at the active site manganese. **Journal Biological Chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13646-13648, 1983.

- KÖPRÜÇÜ, K.; AYDIN, R. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp *Cyprinus carpio* embryos and larvae. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 80, p. 47-53, 2004.
- KÖPRÜCÜ, S.S., et al. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some haematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). **Pest. Biochem. Physiol.**, v.86, p. 99-105, 2006.
- KORKMAZ, N., et al. Cypermethrin-induced histopathological and biochemical changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the protective and recuperative effect of ascorbic acid **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 28, p.198-205, 2009.
- KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R.S. Preliminary evaluation of the toxicity of cypermethrin and lambda-cyhalothrin to *Channa punctatus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, n. 79, p. 613-616, 2007.
- 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 and Physiology**, n. 93, p. 96-99, 2009.
- KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R.S. Assessment of acute toxicity of  $\lambda$ -cyhalothrin to a freshwater catfish, *Clarias batrachus* **Environmental Chemical Letters**, v.9, p. 43-46, 2011a.
- KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R.S. Cypermethrin induced alterations in nitrogen metabolism in freshwater fishes **Chemosphere**, v.83,n. 4, p. 492-501, 2011b.
- KUMAR, S. Mode of action of pyrethroid on energy dependent molecules and inorganic ions in *Clarias batrachus*. **International Journal of Biology, Ecology and Environmental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 21-24, 2012a.
- KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R.S. Assessment of stress in effect to pyrethroid insecticides,  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin, in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) **Cell. Mol. Biol.**, v. 58, n.1, p. 153-159, 2012b.
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. In: WALKER, J.M. (Ed.). **Methods in molecular biology**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1994.
- LAWRENCE, L.J.; CASIDA, J.E. Pyrethroid toxicology: mouse intracerebral structure –toxicity relationships. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.18, p. 9–14, 1982.
- LEWIS, W.M.; MORRIS, D.P. Toxicity of nitrite to fish: a review **Trans. Amer. Fisher. Soc.**, v. 115, p. 183-195, 1986.
- LI, M.; et al. NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*) **Aquatic Toxicology**, v.146, p. 82-92, 2014.
- LIMA, A.O., et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 4.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1969. 653p.
- LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat. Toxicol.**, v.101, p.13-30, 2011.
- LUTNICKA, H.; BOGACKA, T.; WOLSKA, L. Degradation of pyrethroid in an aquatic ecosystem model **Water Res.**, v. 33, n. 16, p. 3441- 3446, 1999.
- MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 148, p. 265-272, 2008.
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review **Can. J. Fish. Aq. Sci.**, v.42, n. 4, p. 630-648, 1985.

- MARINO, D. ; RONCO, A. Cypermethrin and Chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.75, p.820-826, 2005.
- MARSHALL, W.S. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis **J. Exp. Zool.**, v. 293, p. 264-283, 2002.
- MARTINEZ, C.B.R., et al. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* **Braz. J. Biol.**, v.64, n.4, p. 797-807, 2004.
- MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M.; MORALES, A.E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors **Rev. Fish Biol. Fisher.**, v. 15, p. 75-88, 2005.
- MATSUOKA, T. Determination of methemoglobin and carboxyhemoglobin in blood by rapid colorimetry. **Biol. Phar. Bull.**, v.20, n.11, p.1208-1211, 1997.
- MAUND, S.J., et al. Aquatic Ecotoxicology of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin: considerations for higher-tier aquatic risk assessment **Pest. Sci.**, v. 54, p. 408-417, 1998.
- MCCARTHY, L.S.; HOUSTOUN, A.H. Effects of exposure to sublethal levels of cadmium upon water-electrolyte status in goldfish (*Carassius auratus*) **J. Fish Biol.**, v.9, n.1, p. 11-19, 1976.
- MCCORMICK, S.D., et al. Are we missing a mineralocorticoid in teleost fish? Effects of cortisol, deoxycorticosterone and aldosterone on osmoregulation, gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and isoform mRNA levels in Atlantic salmon. **General and Comparative Endocrinology**, v.157, p. 35-40, 2008.
- MELETHIL, S.L.; WASON, W.E.; CHIANG, C. Dose dependent absorption and excretion of vitamin C in humans **International Journal of Pharmacology**, v. 31, p. 83-89, 1986.
- MISHRA, D.; SRIVASTAVA, S.K.; SRIVASTAVA, A.K. Effects of the insecticide cypermethrin on plasma calcium and ultimobranchial gland of a teleost, *Heteropneustes fossilis*. **Ecotox. Environ. Saf.**, n. 60, p. 193-197, 2005.
- MOHAPATRA, S., et al. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). **Pest. Biochem. Physiol.**, n. 104, p. 28-37, 2012.
- MONTANHA, F.P., et al. Clinical biochemical and haemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 3, p. 697-704, 2014.
- MONTEIRO, M., et al. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: application to biomonitoring. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 62, p. 341-347, 2005.
- MOORE, A.; WARING, C.P. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquatic Toxicol.**, v. 52, p. 1-12, 2001.
- MORAES, G., et al. Biochemical and hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus carapo* (LINNAEUS, 1758) exposed to environmental hypoxia **Braz. J. Biol.**, v. 62, n. 4A, p. 633-640, 2002.
- MORAES, F.D. **Respostas bioquímicas, genotóxicas, fisiológicas e histológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz 1829) exposto à cipermetrina (Galgotrin®)**. 2013. 145f. Tese (Doutorado Ciências) –Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013a.

- MORAES, F.D., et al. Acute toxicity of pyrethroid-based insecticides in the Neotropical freshwater fish *Brycon amazonicus*. **Ecotoxicol. Environ. Contam.**, v.8, n. 2, p. 59-64, 2013b.
- MOREIRA, S.M., et al. Ecotoxicological tools for the tropics: Sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.73, p. 893-899, 2010.
- MURANLI, F.D.; GÜNER, U. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mut. Res.**, v.726, n. 2, p. 104-108, 2011.
- MUTHUVIVEGANANDAVEL V., et al. Synthetic pyrethroid effect on blood plasma biomarker enzymes and histological changes in *Catla catla*. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.94, n. 2, p. 104-108, 2013.
- NARAHASHI, T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. **Pharmacol. Toxicol.**, v.78, p. 1-14, 1996.
- NARAHASHI, T., et al. Ion channels as targets for insecticides **Neurotoxic.**, v.19, p.581-590, 1998.
- NORUM, U., et al. Behavioural changes in three species of freshwater macroinvertebrates exposed to the pyrethroids lambda-cyhalothrin: Laboratory and stream microcosm studies **Aquat. Toxicol.**, v.98, p. 328-335, 2010.
- NUNES, B. The use of cholinesterases in Ecotoxicology. In: WHITACRE, D.M. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Nova Iorque, NY: Springer Science & Business Media, 2011. p. 29-53.
- OECD. The organization for economic co-operation and development. **Guideline for testing of chemicals – Fish acute toxicity test**. Disponível em: < <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9720301e.pdf?expires=1423076088&id=id&accname=guest&checksum=68B9ECC20848B89A55F2037A895F91AB>> Acesso em: 30/08/2014, 1992.
- OOST, R.V.D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.13, p. 57-149, 2003.
- PARMA, M.J.; LOTESTE, A.; CAMPANA, M., BACCHETTA, C. Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin **J. Environ. Biol.**, v. 28, n.1, p. 147-149, 2007.
- PARVEZ, S.; RAISUDDIN, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 20, n.1, p. 112-117, 2005.
- PAUL, E.A.; SIMONIN, H.A. Effects of naled, synergized and non-synergized resmethrin on the swimming performance of young trout. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 57, p. 495-502, 1996.
- PAYNE, J.F., et al. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland **Mar. Poll. Bull.**, v.32, n.2, p. 225-231, 1996.
- PÉREZ-CAMPO, R., et al. A comparative study of free radicals in vertebrates – I. Antioxidant enzymes. **Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.**, v. 105, n. 3-4, p. 749-755, 1993.
- PIMPÃO, C.T.; ZAMPRONIO, A.R.; SILVA DE ASSIS, H.C. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pest. Biochem. Physiol.**, 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*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.33, p. 414-420, 2012.
- PINER, P.; ÜNER, N. Neurotoxic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the brain of *Oreochromis niloticus*. **Environ. Toxicol.**, v. 29, n. 11, p. 1275-1282, 2014.
- 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. 30, 339–352, 1994.
- PRASHANTH, M.S.; DAVID, M. Impact of cypermethrin on  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ,  $\text{Ca}_2^+$  and  $\text{Mg}_2^+$  ATPases in Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 84, p. 80-84, 2010.
- PRUSTY, A.K., et al. Effect of short-term exposure of fenvalerate on biochemical and haematological responses in *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.100, n. 2, p. 124-129, 2011.
- QUABIUS, E. S.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 108, p. 472 – 482, 1997.
- RAY, D.E.; FRY, J.R. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. **Pharmacol. Therap.**, v. 111, p. 174-193, 2006.
- REBEC, G.V.; PIERCE, R.C. A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. **Prog. Neurobiol.**, v.43, p.537-565, 1994.
- REDDY, P.M.; PHILIP, G.H. In vivo inhibition of AChE and ATPase in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 52, p. 619-626, 1994.
- REGOLI, F., et al. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquat. Toxicol.**, v. 105, n. 3-4, p. 56-66, 2011.
- RICHARDSON, D.J., et al. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): do mussels integrate biomarker responses? **Mar. Poll. Bull.**, n. 57, p. 321-328, 2008.
- RICHTEROVÁ, Z., et al. Effects of cyhalothrin-based pesticide on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). **BioMed Res. Int.**, ID 107373, 7p., 2014.
- ROSSI, P.A. **Alterações bioquímico-fisiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) exposto a um inseticida à base de deltametrina**. 2013. 89f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- RUSSO, C., et al. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.57, p. 168-174, 2004.
- SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 80, p. 49-52, 2008.

- SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Effects of cypermethrin on some biochemical parameters and its amelioration through dietary supplementation of ascorbic acid in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. **Chemosphere**, v.74, n.9, p. 1254-1259, 2009.
- SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretroides – uma visão geral. **Alimentação e Nutrição**, v. 18, n.3, p. 339-349, 2007.
- SARAVANAN, R.; REVATHI, K.; MURTHY, P.B. Lambda cyhalothrin induced alterations in *Clarias batrachus*. **J. Environ. Biol.**, v. 30, n.2, p. 265-270, 2009.
- SATHYA, V., et al. Acute and sublethal effects in an Indian major carp *Cirrhinus mrigala* exposed to silver nitrate: gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, plasma electrolytes and biochemical alterations. **Fish Shell. Immunol.**, v.32, p. 862-868, 2012.
- SAXENA, K.K.; SETH, N. Toxic effects of cypermethrin on certain hematological aspects of fresh water fish *Channa punctatus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.69, p. 364-369, 2002.
- SAYEED, I., et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotox. Environ. Saf.**, v.56, p. 295-301, 2003.
- SCHLENK, D., et al. Biomarkers In: DI GIULIO, R.T.; D.E. HINTON (Ed.). **The Toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008. p. 683-731.
- SCHIMMEL, S.C., et al. Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222,705, benthiocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methylparathion, and permethrin in the estuarine environment. **J. Agric. Food Chem.**, v. 31, n.1, p. 104-113, 1983.
- 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.>. Acesso em 30/10/2014. 1998.
- SCOTTISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – SEPA. Attachment XIV. **Guidance note on the licensing of discharges of AMX (deltamethrin) at marine cage fish farms**. Disponível em: <<http://sepa.org.uk/aquaculture/policies/index.htm> FFM\_att-14\_Guidance%20note%20on%20the%20licensing%20of%20discharges%20of%20AMX%20\_deltamethrin\_%20at%20marine%20cage%20fish%20farms%20(1).>. Acesso em 30/10/2014. 2008.
- SELYE, H. **The stress of life**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1956.
- 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.
- SHAFER, T.J.; MEYER, D.A. Effects of pyrethroids on voltage-sensitive calcium channels: a critical evaluation of strengths, weaknesses, data needs, and relationship to assessment of cumulative neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, p. 303-318, 2004.
- SHAFER, T.J.; MEYER, D.A.; CROFTON, K.M. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. **Environ. Health Persp.**, v. 113, n. 2, p. 123 – 136, 2005.
- SHARMA, R., et al. Antioxidant role of glutathione-S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. **Antiox. Redox Signal.**, n. 6, p. 289-300, 2004.

- SINHORIN, V.D.G., et al. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). **Ecotox. Environ. Saf.**, v.106, p. 181-187, 2014.
- SODERLUND, D.M.; BLOOMQUIST, J.R. Neurotoxic action of pyrethroid insecticides. **Ann. Rev. Entomol.**, v.34, p. 77-96, 1989.
- SODERLUND, D.M., et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicol.**, v.171, p. 3-59, 2002.
- SOGORB, M.A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamates and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicol. Letters**, v.128, p. 215-228, 2002.
- STAICU, A.C., et al. Histological changes in deltamethrin-induced intoxication in *Carassius auratus gibelio* (Pisces-cyprinidae) **Biotech. Anim. Husb.**, v.23, n.5-6, p. 619-626, 2007.
- SUVETHA, L.; RAMESH, M.; SARAVANAN, 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*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 29, p. 44-49, 2010.
- SVOBODOVÁ, Z., et al. Effect of deltamethrin on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Vet. Brno**, n. 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. **Ecotox. Environ. Saf.**, v.31, p.258-263, 1995.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2<sup>nd</sup> ed. Bunkyo, Tokyo: Gustav Fischer Verlag. 1995. 195p.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Biosc. J.**, v.19, p. 103-110, 2003.
- TOUMI, H., et al. Is acetylcholinesterase a biomarker of susceptibility in *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) after deltamethrin exposure? **Chemosphere**, v.120, p. 351-356, 2015.
- TRIPATHI, G.; BANDOONI, N. Impact of alphamethrin on antioxidant defense (catalase) and protein profile of a catfish. **Environmentalist**, n. 31, p. 54-58, 2011.
- TU, W., et al. Dynamics of uptake and elimination of pyrethroid insecticides in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryos. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 107, p. 186-191, 2014.
- UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquat. Toxicol.**, v.79, p. 201-204, 2006.
- ÜNER, N., et al. Effects of cypermethrin on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in liver and kidney of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* (L.). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.67, p. 657-664, 2001.
- URAL, M.S.; SAGLAM, N. A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972). **Pestic. Biochem. Physiol.**, n. 83, p. 124-131, 2005.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, USEPA. **Lambda-cyhalothrin. Human health risk assessment for the proposed food/feed uses of the insecticide on cucurbit vegetables (group 9), tuberous and corn vegetable (subgroup 1C), grass forage, fodder, and hay (group 17), barley, buckwheat, oat, rye, wild rice, and pistachios**. 2008.

- Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/chemical/foia/cleared-reviews/reviews/128897/128897-2007-07-18a.pdf>> Acesso em 22/04/2010.
- VANI, T., et al. Alteration in haematological and biochemical parameters of *Catla catla* exposed to sub-lethal concentration of cypermethrin. **Fish Physiol. Biochem.**, v.38, n.6, p.1577-84, 2012.
- VARANKA, Z., et al. Influence of the polyphenolic tannic acid and the toxicity of the insecticide deltamethrin to fish. A comparative study examining both biochemical and cytopathological parameters. **Acta Biol. Hungarica**, v. 53, n. 3, p. 351-365, 2002.
- VELISEK, J., et al. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Vet. Med.**, v.51, n.10, p. 469-476, 2006.
- VELISEK, J., et al. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.23, n.3, p. 297-301, 2007.
- VELMURUGAN. B.; AMBROSE, T.; SELVANAYAGAM, M. Genotoxic evaluation of lambda-cyhalothrin in *Mystus gulio*. **J. Environ. Biol.**, v.27, n.2, p. 247-250, 2006.
- VELMURUGAN, B., et al. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.24, p. 286-291, 2007.
- VELMURUGAN, B.; MATHEWS, T.; CENGIZ, E.I. Histopathological effects of cypermethrin on gill, liver and kidney of fresh water fish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and recovery after exposure. **Environ. Technol.**, v.30, n.13, p. 1453-1460, 2009.
- VERSCHOYLE, R.D.; ALDRIDGE, W.N. Structure–activity relationships of some pyrethroids in rats. **Arch. Toxicol.**, v.45, p. 325-329, 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 em água e análise por CG. **Química Nova**, v.30, n.3, p. 535-540, 2007.
- VIJVERBERG, H.P.M.; Van Den BERCKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. **Cr. Rev. Toxicol.**, v.21, p. 105-126, 1990.
- VONTAS, J.G., et al. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione-S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. **Biochem. J.**, v. 362, p. 329-337, 2002.
- VUTURUKU, S.S. Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, hematological parameters and some biochemical profiles of the Indian major carp, *Labeo rohita*. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 2, n.3, p. 456-462, 2005.
- WANG, W., et al. Comparison of the acute toxicity for gamma-cyhalothrin and lambda-cyhalothrin to zebra fish and shrimp. **Reg. Toxicol. Pharmacol.**, v.47, p. 184-188, 2007.
- WENJU, X.U., et al. Effects of phenanthrene on hepatic enzymatic activities in tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). **J. Environ. Sci.**, v.21, p. 854-857, 2009.
- WESTON, D.P.; YOU, J.; LYDY, M.J. Distribution and toxicity of sediment-associated pesticides in agriculture-dominated water bodies of California's Central Valley. **Environ. Sci. Technol.**, v.38, p. 2752-2759, 2004.
- WESTON, D.P., et al. Aquatic toxicity due to residential use of pyrethroid insecticides. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 9778-9784, 2005.

- WHEELOCK, C.E., et al. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. **Aquat. Toxicol.**, v.74, n.2, p. 172-192, 2005.
- WINTROBE, M.M. Variations in size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematol.**, v. 51, p. 32-49, 1934.
- WOLANSKY, M.J.; HARRIL, J.A. Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: A critical review. **Neurotox. Teratol.**, v.30, p. 55-78, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles **Environmental Health Criteria 155**, World Health Organization, Geneva, 1993.
- YABU, H., et al. Two types of Ca channels in smooth muscle cells isolated from guinea-pig taenia coli. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.255, p. 129-134, 1989.
- YADWAD, V.B.; KALLAPUR, V.L.; BASALINGAPPA, S. Inhibition of gill Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase activity in dragonfly larva, *Pantala favenses*, by endosulfan. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 44, p. 585-589, 1990.
- YEKEEN, T.A.; FAWOLE, O.O.; BAKARE, A.A. Evaluation of toxic effects of lambda-cyhalothrin on the haematology and selected biochemical parameters of African catfish *Clarias gariepinus* **Zool. Ecol.**, v.23, n.1, p. 45-52, 2013.
- YILDIRIM, M.Z., et al. Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltamethrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. **Environ. Toxicol.**, v.21, n. 6, p. 614-620, 2006.
- YONAR, M.E.; SAKIN, F. Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.99, p. 226-231, 2011.
- ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEING, M.A. Potencialidad del género *Brycon* em la piscicultura brasileña **Rev. Col. Cienc. Pec.**, v.19, p. 233-240, 2006.