

Universidade Federal de São Carlos

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Departamento de Genética e Evolução

Priscila Adriana Rossi

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS EM PACU
(*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) EXPOSTO A UM
INSETICIDA À BASE DE DELTAMETRINA**

São Carlos - SP

2013

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
Departamento de Genética e Evolução

Priscila Adriana Rossi

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICAS EM PACU
(*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) EXPOSTO A UM
INSETICIDA À BASE DE DELTAMETRINA**

Dissertação 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 Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

São Carlos - SP

2013

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

R833ab Rossi, Priscila Adriana.
Alterações bioquímico-fisiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) exposto a um inseticida à base de deltametrina / Priscila Adriana Rossi. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
89 f.

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

1. Bioquímica. 2. Pacu (Peixe). 3. Inseticida piretróide. 4. Metabolismo. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

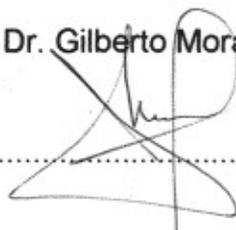
CDD: 574.192 (20ª)

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

Dissertação de Mestrado de
PRISCILA ADRIANA ROSSI

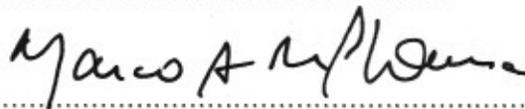
Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Moraes



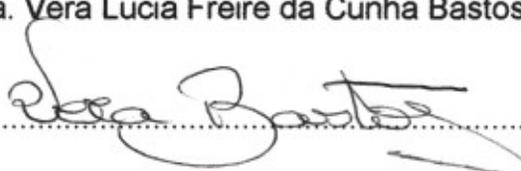
.....

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama



.....

Profa.Dra. Vera Lucia Freire da Cunha Bastos



.....

Dedico este trabalho àqueles que são, acima de tudo, a minha base: meus pais, Maria e Edson, e meu irmão, Ednilson.

Agradecimentos

Ao querido Prof. Gilberto, pela orientação de tantos anos, pela confiança, apoio, amizade e por me ensinar muito mais do que Ciência.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Adaptativa, que continuam ou que seguiram seus caminhos: Araceli, Camila, Fernanda, Fernando, Francine, Ive, Josi, Lívia, Lícia, Lucas, Rodrigo, Timba. Agradeço pelo companheirismo e pronta ajuda sempre que precisei. Em especial à Fer, Fran e Ive, pelas angústias divididas.

Ao Seu Toninho e ao Piau, pelo trabalho indispensável e pela prontidão em nos ajudar.

Aos meus pais, pelos valores que me deram, pelo carinho de todas as horas, pelos ensinamentos da vida toda e pelo apoio em todas as decisões.

Ao Ednilson, pelo cuidado comigo, pelo apoio e incentivo constantes.

Àqueles com quem eu posso dividir as alegrias e aflições, que fazem os meus dias mais felizes: Ana, Ariadne, Bruno, Clara, Flávia, Luana, Luiz Fernando, Nayara, Sabrina, Xênia.

Aos membros da banca avaliadora, pelas valiosas contribuições e discussões.

Aos docentes e aos colegas do PPGGEv, pelos conhecimentos compartilhados, e à Ivanildes, pela gentileza e disposição.

À Piscicultura Poletini e ao CA-Unesp pela doação dos peixes para a realização dos experimentos.

À empresa Milenia, pela doação do inseticida Keshet[®] 25.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A utilização de substâncias inseticidas é cada vez maior, não só para fins agrícolas, mas também para combate a insetos de relevância para a saúde pública. Nos últimos anos, no entanto, tem-se observado uma substituição dos tipos de pesticida utilizados, diferindo quanto à toxicidade. Os inseticidas piretroides, entre eles a deltametrina, têm sido considerados produtos ideais devido à baixa toxicidade para aves e mamíferos, amplo espectro de ação e não acumulação ao longo da cadeia trófica. Apesar disso, diversos estudos relatam os efeitos tóxicos da deltametrina sobre organismos não alvos, tais como os peixes. Nesses animais, a toxicidade parece ser devida à deficiência na metabolização de piretroides e é revelada por alterações hematológicas, metabólicas e neurológicas, além da indução de estresse oxidativo. O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, é uma das espécies brasileiras que pode ser afetada pela utilização intensa de piretroides. Essa espécie é considerada representativa do Centro-Oeste brasileiro, área que potencialmente consome o maior volume de agrotóxicos à base de deltametrina no país. Assim, os objetivos deste trabalho foram: determinar a toxicidade aguda (CL(I)50;48h) de deltametrina para juvenis de pacu; avaliar as alterações hematológicas; avaliar as alterações do metabolismo intermediário e as defesas antioxidantes de pacus expostos à concentração subletal de deltametrina (10% da CL(I)50;48h) por 96 horas; e avaliar os efeitos *in vivo* de deltametrina sobre a atividade de acetilcolinesterase (AChE) cerebral de pacu. A CL(I)50;48h de deltametrina encontrada para juvenis de pacu foi 17,32 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Após a exposição subletal, o pacu apresentou alterações sanguíneas indicativas de eritropenia e desidratação. As alterações no metabolismo intermediário incluem proteólise muscular e glicogenólise hepática, acompanhadas de hiperglicemia, indicando deslocamento energético para os processos de desintoxicação. Quanto às defesas antioxidantes, a ocorrência de peroxidação lipídica hepática indica estresse oxidativo, com depleção das reservas de antioxidantes não enzimáticos e alterações na atividade de enzimas antioxidantes. A AChE mostrou-se responsiva à deltametrina, uma vez que animais expostos a concentração subletal apresentaram inibição da AChE *in vivo*.

Palavras chave: *Piaractus mesopotamicus*. Piretroide. Metabolismo. Estresse oxidativo. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

The use of insecticides is increasing not only for agriculture purposes but also against threats to public health caused by insects. However, in the last few years it is possible to see a frequent replacement of current pesticides for new others, which differ in toxicity. Pyrethroid insecticides, deltamethrin is an example, are considered ideal xenobiotics due to low toxicity to mammals and birds, a wide range of targets and no biomagnification. Nevertheless, several studies report the toxic effects of deltamethrin on non-target organisms, such as fishes. In this vertebrate group, high toxicity seems to be due to an enzymatic deficiency in hydrolyzing pyrethroids and this fact can be assessed through hematologic, metabolic, neurologic, and oxidative stress investigations. Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, is a freshwater fish from South America and is affected by massive use of pyrethroids. This species is widely known in the Midwest region of Brazil, wherein the largest agrochemicals use takes place. The aim of this study was the acute toxicity determination of deltamethrin (LC(I)50;48h) for pacu juveniles; evaluation of hematologic, metabolic and antioxidant defenses of pacu after 96 h of sublethal exposure to deltamethrin (10% LC(I)50;48h); evaluation of deltamethrin effects on the brain acetylcholinesterase (AChE) *in vivo*. The LC(I)50;48h estimated to deltamethrin in pacu juveniles was 17.32 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. In response to sublethal exposure, pacu depicted blood changes suggestive of erythropenia and dehydration. Metabolic changes included hepatic glycogenolysis, muscle proteolysis, and hyperglycemia, suggesting an overload of the energetic metabolism to serve the detoxification processes. Regarding antioxidant defenses, the occurrence of hepatic lipid peroxidation is indicative of oxidative stress with depletion of non-enzymatic antioxidants and alterations in antioxidant enzymes activity. Also, deltamethrin depicted AChE inhibition in fish exposed to sublethal concentrations.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*. Pyrethroid. Metabolism. Oxidative stress, Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência esquemática simplificada dos eventos de abertura e fechamento de um canal de sódio voltagem-dependente.....	20
Figura 2 – Fórmula estrutural da deltametrina.	22
Figura 3 - Geração de diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO)	27
Figura 4 - Pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887).	33
Figura 5 - Glutathiona reduzida hepática	55
Figura 6 - Atividade específica de catalase (CAT).....	56
Figura 7 - Atividade específica de superóxido dismutase hepática (SOD).....	56
Figura 8 - Atividade específica da glutathiona peroxidase (GPx).....	57
Figura 9 - Atividade específica da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	57
Figura 10 - Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) cerebral.....	58
Figura 11 - Atividade específica de sódio-potássio ATPase branquial.....	58
Figura 12 - Concentração de hidroperóxido de cumeno (HPC).....	59
Figura 13 - Comparação entre as fórmulas estruturais do piretroide tipo I, permetrina, e do piretroide tipo II, cipermetrina.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mortalidade de juvenis de <i>Piaractus mesopotamicus</i> expostos à deltametrina (Keshet®).....	51
Tabela 2 - Variáveis hematimétricas de pacu exposto a concentração subletal de deltametrina (Keshet®).....	53
Tabela 3 - Intermediários metabólicos e enzimas do metabolismo intermediário de fígado, músculo branco e plasma de pacu após exposição subletal à deltametrina (Keshet®).....	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Considerações gerais	14
2.2	Inseticidas piretroides	17
2.3	Deltametrina	21
2.4	Biotransformação e defesas antioxidantes	24
2.5	Alterações hematológicas e no metabolismo energético	29
2.6	Neurotoxicidade	31
2.7	O pacu	32
3	JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Material	36
4.1.1	Animais	36
4.1.2	Reagentes	36
4.1.3	Avaliação Ética	36
4.2	Métodos	37
4.2.1	Estimativa da toxicidade aguda (CL(I)50;48h) de deltametrina (Keshet®)	37
4.2.2	Exposição subletal a 10% da CL(I)50;48h de deltametrina (Keshet®)	37
4.2.3	Determinação dos parâmetros de qualidade de água	38
4.2.4	Variáveis hematimétricas	39
4.2.5	Íons plasmáticos	40
4.2.6	Determinações dos intermediários metabólicos em tecidos e plasma	41
4.2.7	Glutathiona reduzida hepática (GSH)	44
4.2.8	Determinações enzimáticas	45
4.2.9	Peroxidação lipídica	49
4.3	Avaliação estatística	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Estimativa da toxicidade aguda CL _(I) 50;48h de deltametrina (Keshet®) para juvenis de pacu	51
5.2	Exposição subletal a 10% da CL _(I) 50;48h de deltametrina (Keshet®)	52
6	DISCUSSÃO	60

6.1	Estimativa da toxicidade aguda $CL_{(t)50;48h}$ de deltametrina (Keshet[®]) para juvenis de pacu	60
6.2	Exposição subletal a 10% da $CL(I)50;48h$ de deltametrina (Keshet[®]).....	62
6.2.1	Variáveis hematológicas	62
6.2.2	Metabolismo intermediário	65
6.2.3	Metabolismo antioxidante	69
6.3	Neurotoxicidade.....	74
7	CONCLUSÕES	76
8	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Visando garantir a produção agrícola em larga escala, o uso de defensivos agrícolas é cada vez maior. Em 2005, o consumo de agrotóxicos no Brasil ultrapassou 200.000 toneladas de ingrediente ativo e, desde 2008, o país tornou-se o maior mercado mundial de pesticidas. Esse crescimento no consumo de defensivos agrícolas, no entanto, não foi acompanhado por crescimento na produção brasileira, indicando maior consumo por área cultivada (CARNEIRO *et al.*, 2012). Embora a tendência seja de crescimento ainda maior, observa-se um aumento na produção e utilização de produtos considerados menos tóxicos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2004; 2008), em substituição aos pesticidas organohalogenados, organofosforados e carbamatos, que são altamente tóxicos e persistentes (DÓREA, 2008).

Uma classe de inseticidas considerada menos tóxica para mamíferos, e muito utilizada atualmente, é a dos piretroides sintéticos, compostos análogos das piretrinas, inseticidas naturais encontrados no crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Os piretroides são considerados inseticidas ideais devido à baixa toxicidade para mamíferos e aves, ao amplo espectro de ação e por não serem acumulados ou magnificados na cadeia trófica (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). O efeito inseticida geral desses compostos se dá por ação no sistema nervoso central e periférico, especialmente nos canais de sódio voltagem-dependente dos neurônios, impedindo a despolarização. Como resultado, os nervos são constantemente estimulados, levando a tremores e paralisia muscular e, finalmente, à morte (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1990; US-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006).

Entre os piretroides utilizados no Brasil, destaca-se a deltametrina, ingrediente ativo de diversos produtos agrícolas, de inseticidas domésticos e de produtos tópicos para o combate a piolhos e pulgas. É também recomendada para fumegação de casas e ambientes abertos em áreas de ocorrência de malária, além de aplicação na aquicultura, por via oral ou imersão, no combate a ectoparasitas copépodes (ROBERTSON *et al.*, 2009).

A considerada segurança para mamíferos na utilização de piretroides levou a um aumento muito grande em sua aplicação e, conseqüentemente, a um aumento no impacto desses compostos sobre o ambiente. Entre os organismos mais afetados pelos piretroides, entre eles a deltametrina, estão os peixes, que apresentam deficiências na metabolização rápida de piretroides, o que eleva a sensibilidade desse grupo. Esse grupo de organismos apresenta importância crescente no monitoramento de contaminação da água, pois é capaz de

responder com grande sensibilidade a mudanças no ambiente aquático (HERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2010).

Grandes mortalidades de peixes já foram atribuídas à presença de deltametrina nos corpos d'água. No lago Balaton, na Hungria, em 1991, 300 toneladas de enguias *Anguilla anguilla* apareceram mortas; em 1995, a mortalidade foi de 30 toneladas. Análises da água e do sedimento revelaram a presença de grande quantidade de deltametrina, inseticida utilizado contra mosquitos na região (BÁLINT *et al.*, 1997). A presença de inseticidas piretroides também foi considerada responsável pelo declínio das populações de diversas espécies de peixes pelágicos do estuário do rio San Francisco, na Califórnia, apesar das condições ambientais como chuvas e uso do solo serem propícias à reprodução das espécies (BROOKS *et al.*, 2012).

A diferença entre os dois casos referidos está na concentração do piretroide a que os organismos foram expostos e na sensibilidade dos mesmos. Essas observações levam a duas abordagens diferentes na avaliação do efeito de contaminantes sobre os peixes. A primeira abordagem baseia-se na determinação da toxicidade aguda, de modo a definir concentrações que causam efeitos letais diretos. Esses estudos são relevantes para o estabelecimento de legislações acerca da concentração máxima de determinada substância nos corpos d'água. A segunda abordagem na avaliação da toxicidade de um composto é a determinação dos efeitos de concentrações subletais sobre a saúde geral do organismo. Sabe-se que concentrações não letais de deltametrina são capazes de alterar os perfis bioquímicos e fisiológicos dos organismos expostos, podendo, em caso de exposição contínua e prolongada, chegar a causar efeitos deletérios às espécies caso as alterações moleculares sejam suficientes para comprometer os comportamentos de forrageamento, fuga de predadores e reprodução (SCOTT; SLOMAN, 2004).

No Brasil, uma das espécies que podem ser negativamente impactadas pela utilização de inseticidas à base de deltametrina é o pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Essa espécie é nativa da Bacia do Prata e é considerada umas das espécies representantes da região Centro-Oeste. A ameaça ao pacu, em seu habitat natural, vem da grande utilização de piretroides em sua região de distribuição. As maiores concentrações de utilização de agrotóxicos no Brasil coincidem com as regiões de maior intensidade de monoculturas de soja, milho, cana, cítricos, algodão e arroz, culturas para as quais inseticidas à base de deltametrina são indicados. Da região, o Estado de Mato Grosso aparece como o maior consumidor de agrotóxicos, representando 18,9% do mercado nacional (CARNEIRO *et al.*, 2012). Estando sobrepostas as áreas de distribuição do pacu e do uso massivo de inseticidas à base de deltametrina, justifica-

se, então, a avaliação dos efeitos desses compostos sobre a espécie, de modo a embasar o monitoramento da contaminação do ambiente aquático, visando a preservação da espécie.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais

No mundo moderno, é cada vez maior a preocupação com os sintomas da degradação ambiental decorrentes do acúmulo crescente de dejetos urbano-industriais, do uso inadequado dos recursos naturais renováveis e não renováveis, da modificação dos espaços naturais pela urbanização e industrialização. Esses processos resultam na poluição generalizada dos rios e oceanos, na devastação de florestas, na poluição do ar nas áreas urbanas, no acúmulo de dióxido de carbono da atmosfera, na perda de solos cultiváveis e na diminuição drástica da biodiversidade. Essas pressões humanas sobre a natureza, na escala em que se realizam hoje, sobrepujam a capacidade de resiliência, de autorregulação e renovação de muitos ecossistemas terrestres e aquáticos. No entanto, frequentemente esses problemas ambientais são tidos como naturais, espontâneos ou como consequências inevitáveis da vida no homem sobre a terra (DIEGUES, 1998).

Essa visão de naturalidade da poluição é fruto de uma concepção de natureza como recurso para ser utilizado. O indivíduo e as relações sociais são colocados à parte do ambiente, e não como parte integrante do mesmo. Por sua vez, essa concepção é apoiada pelo modelo econômico vigente, disfarçado sob um pretexto sustentável, e que busca manter o padrão de desenvolvimento atual, omitindo o peso da responsabilidade da poluição (LAYRARGUES, 1997). As próprias estruturas governamentais reforçam essa ideia, como pode ser visto pela “justificativa” ao uso de agrotóxicos no relatório de Indicadores de Desenvolvimento Sustentável, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2008, p. 47):

O aumento da produção de alimentos de maneira sustentável continua sendo o grande desafio do setor agrícola. Os agrotóxicos - produtos utilizados para o controle de pragas, doenças e ervas daninhas - estão entre os principais instrumentos do atual modelo de desenvolvimento da agricultura brasileira, centrado em ganhos de produtividade.

Como é indicado pela citação, o uso de agrotóxicos é visto como um instrumento indispensável para a produção agrícola brasileira. Esse é um dos motivos pelos quais o Brasil passou a ser, desde 2008, o maior mercado mundial de agrotóxicos. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos

Agrotóxicos da UFPR, divulgados em 2012, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, enquanto o crescimento do mercado brasileiro foi de 190%. Esse crescimento no consumo de defensivos agrícolas, no entanto, não foi acompanhado por aumento nas áreas de produção, indicando utilização de maiores quantidades desses produtos por área cultivada, maior frequência de aplicações e/ou aumentos da utilização de misturas de vários pesticidas. Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos. Esses estão concentrados em determinadas categorias: os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados; os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas, por 12% e as demais categorias de agrotóxicos, por 29% (WILSON; TISDELL, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2012).

Atualmente no Brasil, estão registrados no Ministério da Saúde, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e no Ministério de Meio Ambiente (MMA), 434 ingredientes ativos e 2.400 formulações de agrotóxicos. Esses produtos são permitidos no Brasil de acordo com os critérios de uso e indicação estabelecidos em suas Monografias. Porém, dos 50 produtos mais utilizados nas lavouras de nosso país, 22 estão proibidos na União Européia (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2012).

Tendo em vista a elevada e crescente utilização de agroquímicos no Brasil, é provável que grande quantidade desses produtos alcance os corpos d'água, impondo riscos à biota aquática e até mesmo à saúde humana. Segundo Lourencetti *et al.* (2005), quando pesticidas são aplicados, particularmente na agricultura, os recursos hídricos superficiais e subterrâneos são os principais destinos. As autoras ainda afirmam que há casos em que menos de 0,1% da quantidade de pesticida aplicado alcança a peste-alvo, enquanto os 99,9% restantes tem potencial para atingir outros compartimentos ambientais, como as águas superficiais e subterrâneas. Ainda, lagos, lagoas e represas são predispostos a receber e acumular contaminantes provenientes de efluentes domésticos e industriais, além de escoamentos de áreas agrícolas, devido à sua configuração e dinâmica de circulação de água específicas, que são diferentes de outros ecossistemas aquáticos (HERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2010).

Há ainda outras formas pelas quais os pesticidas podem atingir o solo e as águas. O Instituto Mundial de Recursos (REPETTO; BALIGA, 1996) lista sete formas de contaminação: aplicação em campo, para controle de ervas daninhas; lavagem de folhas previamente tratadas; manejo, tratamento e descarte inadequados de embalagens vazias; lavagem de equipamentos de aplicação; efluentes não tratados das indústrias de agrotóxicos; e

aplicações diretas na água, para controle de vetores de doenças ou no controle químico de parasitas em peixes.

Dores e De-Lamonica-Freire (2001) defendem que, ainda que grandes descargas de poluentes ocorram, em geral, a concentração de pesticidas na água tende a ser baixa, já que esses são geralmente pouco hidrossolúveis e também devido ao efeito de diluição. Isto, no entanto, não exclui a possibilidade de que concentrações muito altas venham a ocorrer após pesadas chuvas, especialmente quando as áreas ao redor de um pequeno córrego tenham sido recentemente tratadas com altas doses de pesticidas. Efeitos deletérios são geralmente difíceis de detectar nas populações naturais, uma vez que vários desses efeitos tendem a se manifestar apenas após longos períodos de tempo. Quando o efeito torna-se finalmente aparente, o processo destrutivo pode ter ultrapassado o ponto em que seriam possíveis medidas mitigadoras (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Brooks e colaboradores (2012), avaliando o estuário do rio San Francisco, nos Estados Unidos da América, discutem que efeitos diretos de contaminantes em espécies de peixes são raramente observados e correlacionam a presença de níveis elevados de contaminantes com o declínio de espécies de diferentes habitats e histórias de vida. Segundo Scott e Sloman (2004), riscos à sobrevivência das espécies ocorrem em concentrações muito baixas de contaminantes, pois podem tornar o animal inapto à sobrevivência no contexto ecológico.

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos e com os potenciais riscos à saúde humana leva à necessidade de estabelecimento de legislações sobre os limites máximos permitidos de substâncias tóxicas na água. A Comunidade Econômica Européia estabelece em $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a concentração máxima admissível de qualquer pesticida em águas destinadas ao consumo humano. Este limite tem sido motivo de questionamentos, uma vez que não considera a toxicidade específica de cada produto. Por outro lado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelecem níveis máximos para pesticidas individuais em água, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001). No Brasil, a legislação CONAMA 357/2005 e a Portaria 2.914/2011 do Ministério da Saúde estabelecem limites máximos de algumas substâncias para a água considerada potável. Essas listas, entretanto, contemplam apenas alguns agrotóxicos, enquanto outros, extremamente tóxicos para organismos não-alvo, como inseticidas piretroides e a maioria dos herbicidas em uso atualmente, não possuem limites estabelecidos.

2.2 Inseticidas piretroides

A utilização de compostos inseticidas específicos começou em meados do século XX. Antes disso, o controle de pragas era feito utilizando-se agentes inorgânicos, tais como enxofre, arsênico e cianeto, altamente tóxicos para vertebrados. A introdução desses compostos mais específicos promoveu uma suposta revolução no setor agroquímico, uma vez que permitiu a minimização de perdas na produção devido ao ataque de insetos (LÓPEZ; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS; GIL, 2005). Em longo prazo, entretanto, a utilização de inseticidas mostra-se ineficiente e custosa, uma vez que as populações de pragas tornam-se mais resistentes ao pesticida, sendo necessário aplicar quantidades cada vez maiores deste. Outro inconveniente é que o inseticida não é seletivo, e pode, portanto, eliminar os predadores naturais da espécie considerada praga (WILSON; TISDELL, 2001).

Em busca de maior efetividade contra as pragas e menor efeito tóxico sobre organismos não alvo, no decorrer dos últimos 80 anos, foram desenvolvidas as maiores classes de inseticidas. Organoclorados (OC), organofosforados (OP) e carbamatos são reconhecidamente prejudiciais ao ambiente e têm o potencial de afetar a saúde humana, uma vez que atuam sobre o metabolismo como um todo, sendo neurotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e/ou teratogênicos. Apesar de serem menos persistentes que os inseticidas OC, os OP e carbamatos são potencialmente mais tóxicos aos produtores e trabalhadores do campo, especialmente se forem mal utilizados. Dessa forma, o objetivo das pesquisas em pesticidas é encontrar substâncias cada vez mais “verdes”, ou seja, que tenham alta eficácia e seletividade e que não prejudiquem o ambiente ou a saúde humana (LÓPEZ; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS; GIL, 2005).

Nesse sentido, o desenvolvimento dos piretroides é ainda hoje considerado um feito. Essa classe de inseticidas, que despertou interesse a partir do início dos anos 1970, é representada por compostos sintéticos, análogos das piretrinas, substâncias extraídas do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) e com efeito inseticida natural. Elliott (1976) listou as vantagens dos piretroides sobre as piretrinas e sobre outras classes de inseticidas: (1) maior estabilidade no campo, quando comparado a OP e carbamatos, estando ativos após duas semanas na superfície foliar sob luz solar intensa; (2) metabolismo e eliminação rápidos em mamíferos, conferindo baixa toxicidade a esse grupo de organismos; (3) persistência limitada a algumas semanas no solo; (4) maior potência, o que permite taxas de aplicação menores, que minimizam a contaminação ambiental e compensam pelo custo. Essas moléculas são ésteres, geralmente contendo um anel de dimetilciclopropano com um radical variável na

porção ácida, o ácido crisantêmico ou o ácido pirétrico; na porção álcool, estão presentes anéis aromáticos e, às vezes, um grupo α -ciano (SOGORB; VILANOVA, 2002).

Os piretroides são considerados inseticidas ideais devido à baixa toxicidade para mamíferos e aves, ao amplo espectro de ação, sendo mais eficientes que inseticidas OC, OP e carbamatos, e por não serem acumulados ou magnificados na cadeia trófica (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Essas características favoráveis permitiram a aplicação generalizada dos piretroides em praticamente todos os setores de controle de insetos, fazendo com que, em 2004, essa classe de pesticida chegasse a representar 30% do mercado mundial de inseticidas (VIJVERBERG; BERCKEN, 1990; KÖPRÜCÜ; AYDIN, 2004). Segundo dados do sistema Agrofit, do MAPA, o Brasil tem hoje 14 piretroides registrados como ingrediente ativo, com 104 formulações comerciais para uso agrícola, e quatro registrados para uso doméstico (BRASIL, 2013).

O efeito inseticida geral dos piretroides se dá por ação no sistema nervoso central (SNC) e periférico, caracterizando-os como toxinas funcionais, que causam efeitos adversos de forma secundária, como consequência da hiperexcitabilidade neuronal. Isso é demonstrado pela inexistência de danos anatomopatológicos no SNC, mesmo depois de repetidas intoxicações agudas (VIJVEGBERG; BERCKEN, 1990). Como resultado, os nervos são constantemente estimulados; alguns compostos podem produzir sensação de formigamento na pele, enquanto a estimulação contínua provoca tremores, movimentos descontrolados, convulsões, paralisia muscular e, finalmente, a morte (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1990; PROUX *et al.*, 1993; US-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006).

De acordo com os sintomas de intoxicação produzidos em mamíferos, os piretroides foram divididos em duas classes. Os piretroides tipo I são aqueles que não contêm o grupo alfa-ciano como substituinte na estrutura do ácido crisantêmico e cujos efeitos neurológicos têm origem periférica, exibindo a chamada síndrome T (tremores): os sintomas de estágio final de intoxicação são espasmos convulsivos, prostração e morte. Nessa classe são incluídos aletrina, permetrina e resmetrina, inseticidas utilizados em programas domissanitários. Já os piretroides tipo II (cipermetrina, deltametrina e fenpropanato, utilizados contra pragas agrícolas) possuem o grupo substituinte alfa-ciano e causam a chamada síndrome CS (coreoatetose e salivação), exibindo como sintomas de intoxicação efeitos de origem central, como salivação excessiva, movimentos irregulares dos membros e convulsões crônicas. Há alguns piretroides que causam sintomas combinados de tremores e salivação, e são, por isso,

causadores da síndrome intermediária TS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1990; VIJVERBERG; BERCKEN, 1990; ERASLAN *et al.*, 2007).

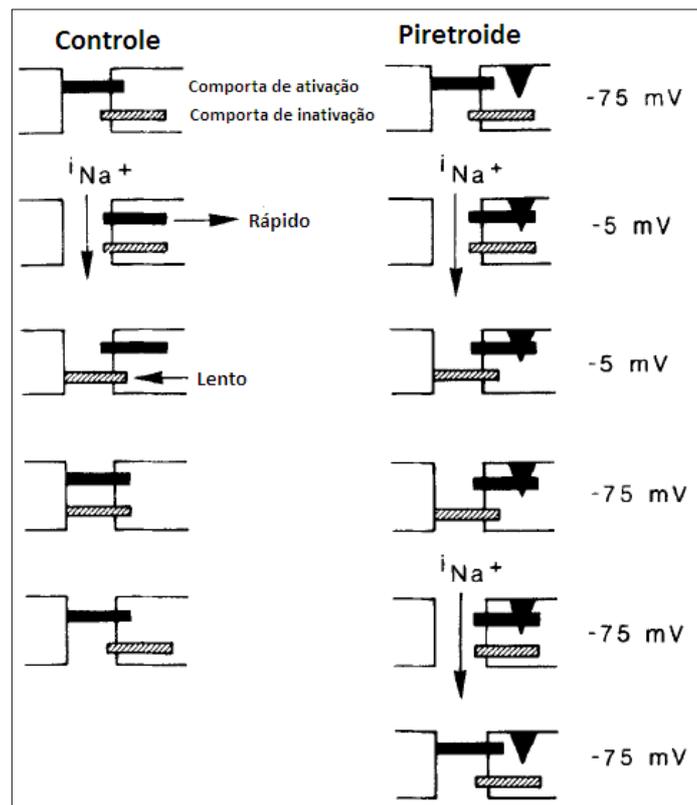
O sítio primário de ação dos piretroides são os canais de sódio voltagem-dependentes das células nervosas. A base para geração de impulsos e condução nervosa está na permeabilidade iônica seletiva de membranas excitáveis combinada com os gradientes de concentração dos íons sódio e potássio: maior concentração de sódio no exterior e maior concentração de potássio no interior da membrana. A membrana em repouso é eletricamente polarizada por esse gradiente de concentração, sendo o interior mantido em -60 a -80 mV em relação ao exterior, graças à bomba de Na^+/K^+ . Um impulso nervoso é gerado por um aumento rápido e temporário na permeabilidade da membrana aos íons sódio, graças à abertura de canais iônicos, resultando em uma entrada transitória de sódio, seguida por saída de potássio. As correntes iônicas causam uma reversão local e passageira do potencial de membrana e o potencial de ação resultante é conduzido ao longo da fibra nervosa. Após um curto período de tempo, os canais iônicos se fecham e a membrana passa pelo processo de repolarização. Os inseticidas piretroides se ligam aos canais de Na^+ , incluindo os receptores de acetilcolina, e modificam sua estrutura, diminuindo a velocidade de fechamento desses canais. Como resultado, a fase de despolarização da fibra nervosa após o potencial de ação é prolongada, chegando a atingir o limiar para excitação, causando estímulos contínuos e repetidos. Esse é o mecanismo responsável pelo efeito inseticida dos piretroides (PROUX *et al.*, 1993).

O modo de ação dos piretroides pode ser explicado segundo o modelo de Hodgkin-Huxley para o funcionamento dos canais de sódio voltagem-dependentes. Segundo esse modelo, a abertura e o fechamento do canal são operados por duas comportas independentes, que são opostamente dependentes do potencial de membrana. Em condições normais, em resposta à despolarização da membrana, ocorre a rápida abertura da comporta de ativação e o fechamento mais lento da comporta de inativação dos canais de Na^+ . Na presença de piretroides o fechamento da comporta de ativação é retardado; no processo de repolarização, esse efeito previne o fechamento rápido do canal de sódio, resultando em uma corrente de entrada de Na^+ prolongada (CHINN; NARAHASHI, 1986; VIJVERBERG; BERCKEN, 1990; NARAHASHI, 1996). O esquema apresentado na Figura 1 mostra o modelo do canal de sódio voltagem-dependente em condições normais e na presença de um inseticida piretroide.

Há ainda outros mecanismos secundários que aumentam a neurotoxicidade dos piretroides, principalmente aqueles do tipo II, tais como inibição dos receptores nicotínicos de

acetilcolina; inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes da membrana pré-sináptica, resultando na não liberação de neurotransmissores; e inibição dos receptores do ácido γ -aminobutírico (GABA), bloqueando os canais de Cl^- e sua ativação, levando à hiperexcitabilidade (NARAHASHI, 1985; SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989; BURR; RAY, 2004). Alguns autores, ainda, têm sugerido efeitos secundários de piretroides em outros componentes do sistema nervoso, como nas enzimas que catalisam a síntese de neurotransmissores, por exemplo, a colina acetiltransferase, e naquelas envolvidas com a terminação do estímulo nervoso, a acetilcolinesterase (AChE) (HOSSAIN *et al.*, 2004; HOSSAIN *et al.*, 2005).

Figura 1 - Sequência esquemática simplificada dos eventos de abertura e fechamento de um canal de sódio voltagem-dependente de acordo com o modelo de Hodgkin e Huxley, em uma situação controle (esquerda) e na presença de um piretroide (direita).



Fonte: Adaptado de VIJVERBERG; BERCKEN, 1990.

A segurança na exposição de mamíferos a piretroides é comprovada por diversos estudos. Segundo Eraslan e colaboradores (2007), ratos alimentados com 30 mg de deltametrina por kg corporal, durante 60 dias, não apresentaram alterações bioquímicas típicas

da contaminação por pesticidas. Isso pode ser explicado pelo fato dos piretroides sintéticos serem rapidamente metabolizados no fígado dos mamíferos, onde são desintoxicados, facilitando a rápida excreção pela urina (BRAGUINI, 2005; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Em cabras mergulhadas em soluções de cipermetrina, os efeitos do tóxico sobre transaminases plasmáticas, indicativas de lesões teciduais e alterações no metabolismo de proteínas, foram transitórios, indicando rápida recuperação dos animais expostos (KHAN *et al.*, 2008).

Para outros grupos animais, no entanto, os piretroides oferecem riscos elevados. A toxicidade seletiva dos piretroides para vertebrados na ordem decrescente de sensibilidade é peixes >> anfíbios \geq mamíferos > aves. Em números, a faixa de letalidade para peixes, representada pela CL-50/96h, é na ordem de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto para ratos, a dose oral letal (DL-50) é de $700\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e para aves, é maior que $2.000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Entre os invertebrados, os artrópodes, que incluem os organismos alvo, são até uma ordem de grandeza mais sensíveis do que os peixes. Por outro lado, microrganismos são relativamente insensíveis a piretroides. A elevada sensibilidade dos peixes aos piretroides, comparados a outros vertebrados, tem sido explicada com base nas taxas de biotransformação, ou seja, quanto menor a biotransformação, maior a toxicidade (HAYA, 1989; US-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006).

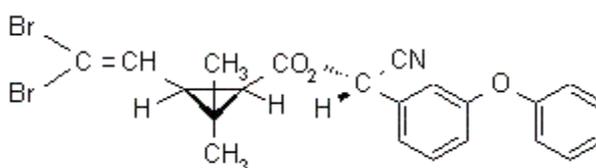
Essa aparente segurança para mamíferos levou à recomendação da utilização de inseticidas piretroides em programas de controle de vetores de doenças, como a malária. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que seja feita a aspersão de piretroides ou de piretroides combinados a inseticidas OP, em domicílios e ambientes abertos, além da impregnação de mosquiteiros com o inseticida, com a finalidade de controlar as populações de mosquitos transmissores de malária (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010). Essa pode ser considerada outra fonte de contaminação de ambientes aquáticos por piretroides, além do uso agrícola e doméstico, colocando em risco organismos não alvo da biota aquática.

2.3 Deltametrina

Um dos piretroides mais utilizados mundialmente é a deltametrina, cuja fórmula estrutural está apresentada na Figura 2. Trata-se de um inseticida de contato e ingestão, indicado para combater pragas de diversas culturas, incluindo frutas, arroz, café, citros, eucalipto, pastagens, algodão, soja e trigo; é o quarto piretroide em número de formulações

para uso agrícola no Brasil (BRASIL, 2013). É também o princípio ativo de muitos inseticidas domésticos e de formulações contra piolhos e pulgas, além de ser recomendado em diversos países, inclusive no Brasil, para o controle de vetores da malária. Mais recentemente, foram disponibilizadas, no mercado norte-americano e europeu, formulações contendo piretroides como ingrediente ativo para uso em aquicultura, no combate a ectoparasitas de salmão. (SEVATDAL; HORSBERG, 2003; ROBERTSON *et al.*, 2009; BURRIDGE *et al.* 2010).

Figura 2 – Fórmula estrutural da deltametrina, (S)- α -ciano-3-fenoxibenzil (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato.



Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Segundo a resolução nº 61/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a deltametrina é uma substância de classificação toxicológica III, ou seja, moderadamente tóxica para aves e mamíferos; e de classificação ambiental I, altamente perigosa ao meio ambiente. Essa informação também está presente na bula dos produtos cujo ingrediente ativo é a deltametrina, acrescidas das informações sobre o uso adequado e precauções. Essas precauções são necessárias para evitar impactos no ambiente, já que diversos efeitos tóxicos da deltametrina em organismos não alvo têm sido relatados. Os principais organismos afetados são comunidades planctônicas (LEBOULANGER *et al.*, 2009), insetos benéficos, como abelhas e coleópteros (BADIOU; BELZUNCES, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2004), crustáceos (THOMAS *et al.*, 2008), peixes (CENGIZ; UNLU, 2006; PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2007; SAYEED *et al.*, 2003; VELISEK *et al.*, 2007; VIRAN *et al.*, 2003) e répteis (ALEXANDER; HORNE; HANRAHAN, 2002).

Uma das formas pela qual a toxicidade de um composto é avaliada é através de testes de toxicidade aguda. O resultado estatístico obtido é o valor de concentração letal inicial mediana ($CL_{(t)50}$) ou a concentração letal mediana (CL_{50}), que representam, respectivamente, a concentração nominal da amostra no início do ensaio ou a concentração real da amostra, e que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição. A

última norma estabelecida pela ABNT (2006) sugere que os ensaios com peixes, em sistema estático, tenham duração de 48 horas.

A deltametrina é altamente tóxica para peixes, com valores de CL₅₀;96h variando entre 0,4 e 2 µg·L⁻¹ para espécies de clima temperado. Há um coeficiente de correlação negativo entre a toxicidade dos piretroides e a temperatura. Essa correlação é possivelmente devida à maior atividade das enzimas microsossomais de biotransformação em temperaturas mais elevadas e ao fato da sensibilidade do sistema nervoso variar com a temperatura (HAYA, 1989; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1990). Isso explica a grande variabilidade nos valores encontrados na literatura para a CL₅₀ de espécies diferentes e até para uma mesma espécie. Para *Ciprinus carpio* foram descritos diferentes valores de CL₅₀;96h de deltametrina: 0,074 µg·L⁻¹, 1,45 µg·L⁻¹ e 3,5 µg·L⁻¹ (KÖPRÜCÜ; AYDIN, 2004; SVOBODOVÁ *et al.*, 2003; DZIAMAN; SITAREK; KLYSZEJKO, 2010); para *Oreochromis niloticus* foram encontrados: 1,70 µg·L⁻¹, 4,85 µg·L⁻¹ e 14,5 µg·L⁻¹ (KARASU BENLI *et al.*, 2009; YILDIRIM *et al.*, 2006; GOLOW; GODZI, 1994; EL-SAYED; SAAD; EL-BAHR, 2007). Além da temperatura em que foi realizado o teste, a fase de desenvolvimento em que o organismo se encontra também interfere nos valores de CL encontrados. Algumas outras espécies que já tiveram o valor de toxicidade aguda de deltametrina determinado foram: *Clarias gariepinus*, com CL₅₀ de 0,004 µg·L⁻¹; *Brycon amazonicus*, 2,6 µg·L⁻¹; *Poecilia reticulata*, 5,12 µg·L⁻¹; *Oncorhynchus mykiss*, 0,69 µg·L⁻¹; *Clarias batrachus*, 0,45 mg·L⁻¹ (DATTA; KAVIRAJ, 2003; CORTELLA, 2010, VIRAN *et al.*, 2003; URAL; SAGLAM, 2005; KUMAR, 2012).

Ainda que a concentração letal de deltametrina para algumas espécies seja tão baixa, a Organização Mundial da Saúde (1990) e alguns outros autores afirmam que concentrações tóxicas não são prováveis de serem encontradas no ambiente natural, apenas em experimentos de laboratório, justificando que esses compostos são adsorvidos pela matéria particulada em suspensão ou pelo sedimento (BURRIDGE *et al.*, 2010). No entanto, estudos mais recentes propõem que os fatores que influenciam o destino, a biodisponibilidade e a toxicidade de inseticidas podem ser diferentes entre condições temperadas e tropicais, principalmente devido às grandes diferenças nos processos físicos, químicos e biológicos existentes nesses ambientes. Como resultado, a grande maioria dos ensaios toxicológicos desenvolvidos nas últimas décadas na Europa e na América do Norte podem não ser diretamente aplicados aos trópicos (MOREIRA *et al.*, 2010). Esses autores fizeram experimentos em que simulavam a ocorrência de chuvas em áreas recém tratadas com um inseticida à base de deltametrina e

observaram que a água de escoamento superficial, que poderia chegar aos rios, mantinha concentrações do piretroide capazes de causar a mortalidade de guarus, *Poecilia reticulata*.

Os dados obtidos por Brooks e colaboradores (2012) também refutam a hipótese de ausência de efeitos negativos nas concentrações ambientais de piretroides. Esses autores analisaram os contaminantes no delta do rio San Francisco (Califórnia, EUA) e o declínio na abundância de múltiplas espécies que se mostrou acelerado por volta do ano 2002. Esse declínio era inesperado, uma vez que o uso das terras ao redor estava estável há muitos anos e graças às chuvas acima da média dos anos anteriores, seria esperado um aumento no sucesso reprodutivo de muitas espécies. Apesar desses fatores, os autores observaram declínio abrupto na abundância de espécies pelágicas, coincidindo com o maior uso de piretroides nas áreas agrícolas, em substituição a inseticidas OP.

Os principais fatores que contribuem para a elevada toxicidade da deltametrina, e dos piretroides em geral, para os peixes são a elevada absorção através das brânquias, o que expõe imediatamente o organismo aos efeitos do tóxico, e sua deficiência nos processos de metabolização de piretroides (HAYA, 1989; SRIVASTAV; SRIVASTAVA; SRIVASTAV, 1997; VELISEK *et al.*, 2007). Desses fatores advêm os efeitos no metabolismo antioxidante e energético dos animais expostos a concentrações que não causam a morte imediata do animal, mas que podem provocar desbalanceamentos profundos em sua fisiologia, chegando a comprometer sua sobrevivência a longo prazo, além da alocação de recursos energéticos para outras funções, como reprodução.

2.4 Biotransformação e defesas antioxidantes

Os organismos têm duas maneiras principais de eliminar um composto químico: através da excreção direta do composto original, em sua forma inicial, ou através do processo de biotransformação. Esse processo leva à formação de uma substância mais hidrofílica e que é mais facilmente excretada em comparação à molécula original; porém, em alguns casos, a biotransformação aumenta a toxicidade, pois origina produtos altamente reativos. O órgão mais comumente envolvido na biotransformação de xenobióticos é o fígado, devido à sua função, posição e suprimento de sangue (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN *et al.* 2003; NICHOLS; SCHLITZ; FITZSIMMONS, 2006).

Piretroides são compostos muito apolares e, como tais, são passíveis de acumulação em tecidos ricos em lipídios. A forma mais eficiente de aumentar a solubilidade de um éster

carboxílico, como a deltametrina, é sua hidrólise, catalisada por carboxilesterases (CbE) em moléculas de álcool e ácido carboxílico. Esses metabólitos são mais solúveis em água e podem ser eliminados pela urina. Essa é a principal via de desintoxicação de piretroides em mamíferos: em ratos, os principais mecanismos são oxidação na posição 4' e clivagem da ligação éster (ANADÓN *et al.*, 1996; SOGORB; VILANOVA, 2002).

No entanto, diferenças na atividade ou na presença de vias metabólicas específicas podem determinar a dimensão da acumulação e da toxicidade de certos compostos para determinadas espécies, e resultar nas grandes diferenças de sensibilidade a um contaminante em particular. Glickman e colaboradores (1979) mostraram que carpas apresentam maior atividade de esterases e maior habilidade para hidrolisar a permetrina do que a truta arco-íris. Porém, peixes, em geral, parecem ser deficientes no sistema enzimático de hidrólise de piretroides, sendo a bile a principal rota para excreção dos metabólitos, significativamente, de produtos conjugados de piretroides hidroxilados. Dessa forma, esse grupo de vertebrados parece ser mais dependente de outras vias de biotransformação, diferentes das CbE (HAYA, 1989; WHEELLOCK; SHAN; OTTEA, 2005).

A biotransformação é didaticamente dividida em duas fases. As reações enzimáticas de fase I envolvem oxidações, reduções e/ou hidrólises, e introduzem ou expõem um grupo funcional do xenobiótico. A fase II consiste em reações de conjugação do xenobiótico, original ou modificado na fase I, com compostos endógenos, como ácido glicurônico, sulfatos, acetato, o tripeptídeo glutathiona ou alguns aminoácidos (HODGSON, 2004; ORELLANA; GUAJARDO, 2004).

As reações de fase I são catalisadas por enzimas mono-oxigenases microsossomais, também conhecidas como sistema de oxidases de função mista, do qual fazem parte o citocromo P450, o citocromo b₅ e a NADPH citocromo P450 redutase. Em peixes, a maioria das reações de biotransformação da fase I é catalisada pela família de citocromos P450, que compreende uma variedade de hemoproteínas de membrana, predominantemente localizadas no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos. Na mecânica das reações catalisadas por esse sistema, há uma série de transferências de elétrons que utilizam o NADPH como doador de equivalentes redutores, além da redução de um átomo de oxigênio molecular à água enquanto outro é incorporado ao substrato e posteriormente hidroxilado. Existem evidências de que nesse processo poderiam ser geradas espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ORELLANA; GUAJARDO, 2004).

As principais enzimas responsáveis pela fase II de biotransformação são a uridina difosfato glicuronosil transferase (UDPGT), sulfotransferase e glutathiona-S-transferase. Elas são responsáveis pela ligação covalente entre o grupo funcional do xenobiótico original, ou aquele inserido na fase I, com algum composto endógeno. Geralmente o conjugado é inativo e é eliminado através da bile.

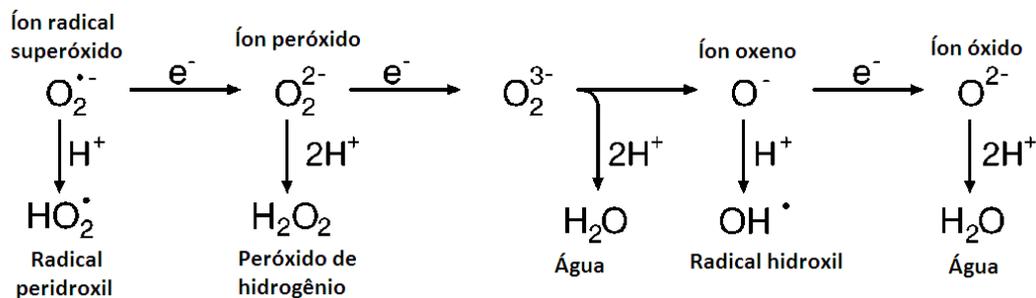
Em ratos tratados por via oral e intravenosa com deltametrina, o metabólito 4'-OH-deltametrina é encontrado, juntamente com a molécula original, no plasma e no cérebro desse animais três horas após a administração. Essas substâncias apresentam meia-vida de 18 a 41 horas, período após o qual os derivados álcool e ácido carboxílico, resultantes da ação de esterases, estão presentes na urina (ANADÓN *et al.*, 1996). Em truta arco-íris, no entanto, após exposição ao piretroide permetrina, Glickman e colaboradores (1981) não identificaram subprodutos de hidrólise de piretroides, apenas o metabólito hidroxilado e seu conjugado com ácido glicurônico. A mesma observação foi feita por Edwards, Millburn e Hutson (1986) analisando comparativamente trutas, sapos, ratos e codornas expostos e tratados com cipermetrina. Segundo esses autores, a elevada concentração do metabólito hidroxilado 4'-OH-cipermetrina no cérebro de trutas indica que esse é o principal produto de biotransformação, seguido pelo conjugado glicurônico na bile. Ambos os estudos corroboram a hipótese de que, em peixes, a metabolização de piretroides se dá principalmente através de reações da fase I, com potencial geração de ERO.

Os produtos de redução do oxigênio molecular são espécies oxidantes de elevada potência e capazes de reagir com macromoléculas celulares, levando à inativação de enzimas, peroxidação lipídica, danos ao DNA e, por fim, à morte celular. Os sistemas biológicos adaptaram, durante a evolução, mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos para proteger os componentes celulares do dano oxidativo, uma vez que a própria respiração celular, no processo de fosforilação oxidativa, em condições normais, pode gerar ERO em pequenas quantidades. Um desbalanceamento entre a geração e a neutralização de ERO pelos mecanismos antioxidantes de um organismo é chamado estresse oxidante (VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Uma característica importante das ERO e que contribui para a necessidade de surgimento de mecanismos de defesa variados é a capacidade de uma espécie reativa originar outras espécies ainda mais agressivas à estrutura celular. A Figura 3 mostra a cascata de reações de formação de ERO a partir do ânion superóxido gerado nas reações de fase I de biotransformação de xenobióticos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser reduzido a radicais hidroxil ($OH\cdot$) na presença de metais de transição, pela reação de Fenton, ou pelo

ânion superóxido, através da chamada reação de Haber-Weiss. Superóxido e H_2O_2 são muito menos reativos do que $\text{OH}\cdot$, e o maior risco para a célula que os produz é a interação entre os mesmos. Como não há neutralizantes para os radicais $\text{OH}\cdot$, a única forma de prevenir o dano oxidativo através desse radical é controlar as reações que podem levar à sua formação. Por esse motivo, foram selecionadas as células que possuíam estratégias sofisticadas para manter as concentrações de superóxido, H_2O_2 e metais de transição tais como ferro e cobre sob controle rígido (APEL; HIRT, 2004).

Figura 3 - Geração de diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO) por transferência de elétrons ou redução univalente sequencial.



Fonte: Adaptado de APEL; HIRT (2004).

A avaliação da ocorrência de danos e de estresse oxidativo em resposta à exposição a poluentes, como a deltametrina, pode ser feita utilizando-se biomarcadores moleculares. Além de avaliar os produtos do dano provocado por radicais livres, podemos avaliar o estado dos mecanismos de defesa antioxidante, através da avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), e de antioxidantes não enzimáticos como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno. Também é possível fazer essa avaliação através de variações na expressão de determinados genes, porém às vezes o nível de RNAm transcritos a partir de determinado gene e a atividade catalítica de seu produto mostram tendências opostas, provavelmente devidas a diferenças temporais de processos pós-transcricionais e de síntese protéica (VALAVANIDIS *et al.*, 2006; REGOLI *et al.*, 2011).

Superóxido dismutases são uma família de metaloenzimas que atuam como a primeira linha de defesa contra as ERO, catalisando a reação de dismutação do superóxido em H_2O_2 : $2 \text{O}_2^{\bullet -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$. Seu papel antioxidante é considerado fundamental, uma vez que estão presentes em todos os organismos aeróbicos. São conhecidas três isoformas de SOD em

eucariotos, com distribuições celulares e metais distintos. A forma citoplasmática contém um átomo de cobre e um de zinco em seu centro catalítico; a forma mitocondrial é formada por quatro subunidades idênticas, cada qual com um átomo de manganês; e a forma extracelular, secretada por fibroblastos, também utilizam átomos de cobre e zinco como cofatores (ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; APEL; HIRT, 2004).

A atividade da CAT previne que o peróxido de hidrogênio formado pela SOD reaja espontaneamente com metais de transição ou com um íon superóxido e origine um radical hidroxil. A reação catalisada é: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Essa enzima está localizada nos peroxissomos, e contém o grupo heme como grupo prostético. Apesar de existirem outras peroxidases com capacidade de utilizar o H_2O_2 como substrato, a CAT é específica para H_2O_2 .

A glutathione peroxidase é uma enzima citosólica capaz de degradar H_2O_2 , assim como peróxidos orgânicos. A atividade da GPx requer glutathione reduzida (GSH) como cosubstrato, fornecendo elétrons para a reação, além de ser selênio-dependente. Como produto, há formação do álcool correspondente ao peróxido e de glutathione oxidada. A importância da GPx reside no fato de esta ser uma alternativa eficiente para manter baixos níveis de H_2O_2 na célula, uma vez que pouca quantidade de CAT é encontrada no citoplasma (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Outra enzima que pode ser utilizada para avaliar o balanço entre pró e antioxidantes celulares é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Essa enzima, do desvio das pentoses, está indiretamente envolvida na defesa contra H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos, uma vez que atua na formação de NADPH, coenzima necessária para a reciclagem de moléculas oxidadas de glutathione, através da atividade da glutathione redutase (REGOLI *et al.*, 2011).

Entre os antioxidantes não enzimáticos podemos destacar a própria glutathione reduzida, que, além de cosubstrato para a GPx e para a GST, na fase II de biotransformação, pode neutralizar radicais livres diretamente, reduzindo-os. Trata-se de um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico (HASSPIELAR; BEHAR; DIGIULIO, 1994; LU, 2009).

Bainy e colaboradores (1996) avaliaram os parâmetros pró e antioxidantes de tilápias do reservatório da represa Billings, na cidade de São Paulo, sabidamente contaminado por efluentes domésticos e industriais. Foram observados aumentos expressivos na atividade dos componentes do sistema hepático de mono-oxigenases, como citocromo P-450 e citocromo b₅, concluindo, então, que a geração de radicais livres derivados de reações desacopladas, ocorre em taxas maiores no fígado do que em brânquias e rim.

Regoli e colaboradores (2011) comprovaram que o nível de transcritos e de atividades das enzimas CAT, GPx e SOD apresentaram-se maiores em fígado do que em brânquias de enguias mantidas em ambiente poluído, confirmando o tecido hepático como o primeiro a combater o desafio oxidante causado pela exposição de peixes a tóxicos, apesar das brânquias serem o primeiro órgão de contato.

Sayeed e colaboradores (2003) obtiveram, como resposta de *Channa punctatus* à exposição a $0,75\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de deltametrina (50% da CL50) por 48 horas, aumento nas atividades de GPx e de GST em fígado e rins, além de níveis de GSH, o que, segundo os autores, foi capaz de promover proteção contra as ERO; no mesmo trabalho, entretanto, observaram que a atividade da CAT pode ter sido inibida pelo excesso de radicais superóxido.

Contrariamente, outros autores reportam a ocorrência de estresse oxidante em resposta ao piretroide. Yousef, Awad e Mohamed (2006) observaram que ratos que receberam doses orais de deltametrina por 30 dias tiveram diminuição da atividade da SOD plasmática. Esse dado, juntamente com a queda da atividade de GST e aumento de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico são indicativos de peroxidação lipídica, mostrando danos de membrana causados pela deltametrina.

2.5 Alterações hematológicas e no metabolismo energético

A utilização de parâmetros hematológicos como biomarcadores tem se mostrado promissora, já que amostras de sangue podem ser regularmente obtidas de organismos teste, permitindo assim, uma abordagem não destrutiva sobre o efeito de contaminantes. Apesar das respostas hematológicas não serem específicas ao tipo de contaminante, elas são importantes para a avaliação geral da fisiologia e do estado de saúde do animal sob investigação (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Vários são os efeitos da deltametrina sobre parâmetros hematológicos de peixes. Svobodová e colaboradores (2003) avaliaram as alterações hematológicas de *Cyprinus carpio* exposto a $0,13\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de um inseticida à base de deltametrina. Foram observadas diminuições nos valores de hematócrito, contagem total de eritrócitos, hemoglobina e proteína total plasmática, a que os autores atribuem a impedimento da hematopoiese. As alterações relatadas para o cascudo (*Ancistrus multispinis*) incluem aumento de hematócrito e de eritrócitos (RBCC), indicativos de hipóxia nos tecidos periféricos, além de leucocitose, por imunossupressão pelo tóxico (PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2007).

Em estudos histológicos, Cengiz e Unlu (2006) mostraram que a deltametrina tem efeito direto sobre as brânquias de *Gambusia affinis*, provocando necrose e descamação de epitélio branquial após 10 dias de exposição subletal. A hipótese de que a exposição à deltametrina leve a deficiências nas trocas gasosas é reafirmada pela ocorrência de hiperplasia moderada e severa das brânquias após exposição a 0,25 e 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de deltametrina, respectivamente, por 30 dias. Essas alterações podem levar a adaptações hematológicas, para garantir o transporte de oxigênio para os tecidos.

A exposição à deltametrina também pode interferir no balanço iônico dos animais expostos. Em gafanhotos *Locusta migratoria*, Proux e colaboradores (1993) sugerem que a alteração na concentração de íons na hemolinfa, em resposta à aplicação de deltametrina, tenha tão ou mais importância na morte do inseto do que as alterações no sistema nervoso. A principal enzima responsável pelo equilíbrio iônico nas brânquias e, conseqüentemente, no sangue de peixes é a Na^+/K^+ -ATPase. Sendo as brânquias o primeiro órgão de contato com contaminantes, a alteração da atividade dessa enzima por ação da deltametrina pode afetar o equilíbrio iônico e osmótico do animal exposto. Prashanth e David (2010) descrevem inibição na atividade de Na^+/K^+ -ATPase branquial de *Cirrhinus mrigala* exposta a uma concentração subletal de deltametrina. Kumar (2012) relata diminuição na concentração iônica de diferentes tecidos de *Clarias batrachus* exposto por 30 dias à deltametrina, e relaciona essa diminuição à inibição de ATPases em geral.

Vários autores sugerem que o processo de desintoxicação de xenobióticos é energeticamente custoso ao organismo, o qual sofre alterações metabólicas de modo a suprir a demanda energética aumentada pelo estresse e pela necessidade de síntese de enzimas de biotransformação (HORI *et al.*, 2006; MORAES, 2009; VENTURINI, 2010).

Em estudos toxicológicos de exposição subaguda, as alterações nas atividades enzimáticas refletem diretamente os distúrbios metabólicos e danos celulares em órgãos específicos (CASIDA *et al.*, 1983). Alterações enzimáticas, bem como nos subprodutos metabólicos, podem indicar alterações no metabolismo intermediário. A atividade da glutamato desidrogenase (GDH) permite avaliar o metabolismo de aminoácidos; a atividade da LDH indica alterações na interconversão lactato-piruvato; as determinações das atividades dessas duas enzimas indicam as inter-relações e modificações das vias metabólicas de proteínas e carboidratos (AGUIAR *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2006).

2.6 Neurotoxicidade

O mecanismo de ação dos inseticidas OP e carbamatos é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Por esse motivo, a atividade dessa enzima é utilizada como um biomarcador de neurotoxicidade amplamente empregado, sendo considerado um dos mais antigos biomarcadores de efeito (PAYNE *et al.*, 1996). A inibição da AChE leva ao acúmulo de acetilcolina nas sinapses, com impedimento da função nervosa, que pode resultar na morte do organismo. Nos últimos anos, vários estudos têm indicado que a AChE é sensível também a outros tipos de contaminantes ambientais, como metais, detergentes e misturas complexas de poluentes (MONTEIRO *et al.*, 2005). Segundo Hernández-Moreno e colaboradores (2010), inibição ou indução de biomarcadores *in vivo* são consideradas boas ferramentas para avaliar a exposição e os potenciais efeitos de xenobióticos nos organismos vivos.

Essa enzima é responsável por catalisar a clivagem do neurotransmissor acetilcolina em acetato e colina, e cessar a estimulação do neurônio pós-sináptico ou da placa motora. Pertence à família das serino-hidrolases, sendo altamente conservada, com mais de 60% de identidade de resíduos entre as formas de mamíferos e da raia *Torpedo*. Apresentam grande polimorfismo estrutural, refletido nas múltiplas formas de ancoragem na face celular externa. O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica contendo os resíduos dos aminoácidos histidina, ácido glutâmico e serina, à qual os inseticidas OP e carbamatos se ligam, impedindo a catálise enzimática. Outras duas regiões relevantes na estrutura tridimensional são a bolsa do sítio ativo e o sítio aniônico periférico. A primeira é formada por 14 resíduos aromáticos, formando uma estrutura que facilita a difusão do substrato até o sítio ativo, localizado em sua base. O sítio aniônico está envolvido na formação de um complexo que facilita a entrada do substrato na bolsa do sítio ativo (TAYLOR, 1991; TAYLOR; RADIC, 1994).

Nos peixes, a inibição da AChE pode ser perigosa, especialmente no coração, cérebro e músculo. O efeito da diminuição da atividade da AChE cardíaca é similar ao efeito vago, ou seja, diminuição do ritmo cardíaco. Já a inibição das atividades da AChE cerebral e muscular implica em distúrbios na atividade natatória, alimentação e comportamento de fuga (BÁLINT *et al.*, 1995).

Na literatura, há alguns estudos que se referem à neurotoxicidade dos piretroides em peixes. *Channa punctatus* exposto a concentrações subletais de λ -cialotrina apresentou reduções significativas da atividade de AChE cerebral, muscular e branquial (KUMAR *et al.*, 2009). Em carpa comum, após exposição à deltametrina, a atividade da AChE não sofreu alterações no cérebro, coração, músculo branco e fígado; houve ligeira queda da atividade

apenas no plasma. Entretanto, houve diferenças quanto às formas moleculares da AChE encontradas, indicando que a deltametrina pode alterar a distribuição das formas dessa enzima, mesmo sem alterar sua atividade (SZEGLITES *et al.*, 1995). Hernández-Moreno e colaboradores (2010) observaram discreto efeito inibitório na AChE de *Tinca tinca* por até 20 dias depois da exposição à deltametrina por 60 dias.

Em ratos, no entanto, a resposta à exposição ao piretroide é diferente. Husain, Adhami e Seth (1996) observaram aumentos significativos na atividade da AChE de várias porções do cérebro após administração oral de deltametrina por 15 dias. Resultado diferente foi observado por Hossain *et al.* (2005) após injeções intraperitoneais subletais do piretroide. Esses autores relacionaram os efeitos agudos no sistema nervoso central não com alterações na AChE, mas sim com modulações da síntese e liberação de acetilcolina. As diferenças observadas nas respostas de peixes e mamíferos podem ser devidas a diferenças nos processos de metabolização e biotransformação de piretroides entre esses grupos de vertebrados.

Devido a não observação de um padrão na atividade da AChE em resposta à exposição dos organismos à deltametrina, alguns autores buscaram, através de ensaios *in vitro*, avaliar se a deltametrina teria algum efeito direto sobre a enzima. Badiou e Belzunces (2008) avaliaram a cinética de AChE de abelhas na presença de deltametrina e concluíram que o inseticida não causa efeitos diretos sobre a enzima. Já quando a fonte de enzima para o ensaio *in vitro* foram amostras de cérebro de *Cyprinus carpio*, Bálint e colaboradores (1995) obtiveram como resultado uma inibição do tipo mista da AChE, com aumento no valor da constante de dissociação do complexo enzima-substrato (K_M) e diminuição de $V_{máx}$ aparente. Os autores relacionam essa inibição a alterações no centro catalítico da enzima ou a modificações na estrutura da mesma.

2.7 O pacu

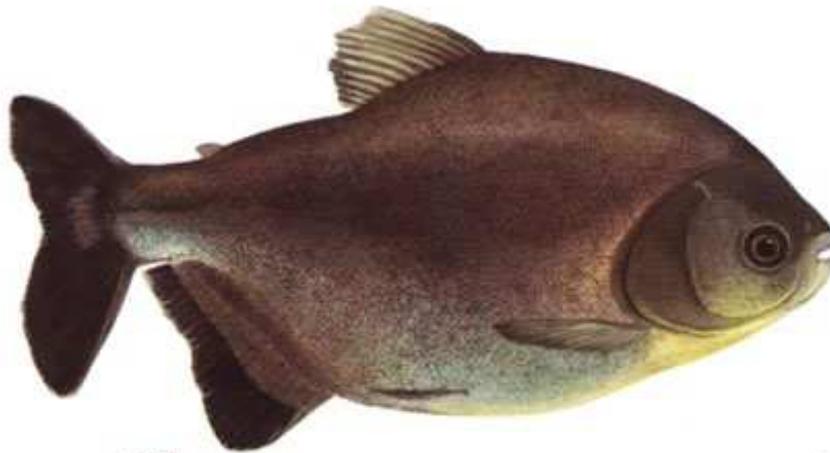
Peixes são geralmente considerados os organismos mais práticos para monitoramento de poluição nos sistemas aquáticos, pois são encontrados praticamente em todo ambiente aquático e tem papel ecológico no transporte de energia dos níveis tróficos inferiores para os superiores (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Uma das espécies de maior importância atualmente no Brasil é o pacu, *Piaractus mesopotamicus*, também chamado de pacu do Pantanal, pacu-guaçu, pacu-caranha e caranha (Figura 4). É um peixe de escamas, cujo corpo é rombóide e lateralmente achatado, de coloração cinza escuro a prata nas partes lateral e dorsal e ventre amarelo-dourado

característico (BRITSKI, 1970). Tem hábito alimentar onívoro, alimentando-se principalmente de folhas, caules, flores, frutos e sementes e, oportunamente, de insetos, aracnídeos, moluscos e outros peixes. No ambiente natural, o pacu não tem comportamento alimentar contínuo e seu ciclo de vida está estritamente relacionado a períodos de alta ingestão de carboidratos. Sua alimentação sofre flutuações de acordo com a disponibilidade do alimento, em consequência de variações ambientais e da migração reprodutiva (URBINATI; GONÇALVES, 2005).

É um representante da superordem Ostariophysa, na ordem Characiformes, na qual se incluem os peixes de maior valor comercial na pesca e piscicultura brasileiras, além de ser o grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul. A espécie é natural da Bacia do Prata, que inclui as sub-bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, e é considerada a grande representante da região. Sua maior distribuição ocorre nas planícies alagadas da região Centro-Oeste, no Pantanal do Mato Grosso (CRESCÊNCIO, 2005). Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2013), o pacu é uma das espécies representativas da piscicultura da região centro-oeste, juntamente com o tambaqui e os pintados.

Figura 4 - Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).



Fonte: Go Pantanal. Disponível em <http://www.gopantanal.com.br>

A realização de estudos ecotoxicológicos utilizando o pacu justifica-se por sua importância econômica e também pelas adaptações que a espécie apresenta. Por ser nativo da região do Pantanal, o pacu está sujeito a flutuações no nível da água e na concentração de oxigênio, podendo sobreviver a períodos de hipóxia, por vezes seguidos de reoxigenação súbita, o que pode levar à geração de ERO. Dantas (2010) descreve atividade elevada da enzima glutatona peroxidase quando comparado a outras espécies, sugerindo que essa seja

uma adaptação bioquímica do pacu às variações ambientais de seu hábitat natural. Além disso, geralmente não são utilizadas espécies nativas em testes de toxicidade de efluentes industriais e de pesticidas, motivo pelo qual Rand (2008) discute a importância de programas de toxicidade aquática incluírem em suas avaliações, espécies de peixes nativas com diferentes estratégias de comportamento.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

No ambiente aquático, devido a fatores de diluição, geralmente os organismos estão expostos a níveis subletais dos poluentes, a menos que estejam em locais de descarga pontual dos contaminantes. Justifica-se, portanto, a avaliação de concentrações subletais, que não causem nenhuma mortalidade na espécie avaliada, mas que podem causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a médio e longo prazo. Entre os contaminantes que podem alcançar os corpos d'água e causar prejuízos à biota local, destacam-se os pesticidas utilizados na agricultura, estando os inseticidas piretroides incluídos entre os agentes de ampla utilização e elevada toxicidade para peixes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos bioquímico-fisiológicos da exposição subletal de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, ao inseticida piretroide deltametrina (na formulação comercial Keshet[®]). Para isso, a seguinte estratégia experimental foi adotada:

1. Determinação da toxicidade aguda (CL(I)50;48h) de deltametrina para juvenis de pacu;
2. Exposição de juvenis de pacu à concentração subletal de deltametrina (10% da CL50(I);48h) por 96 horas e posterior avaliação dos efeitos da exposição sobre a hematologia, o metabolismo intermediário e os mecanismos de defesa antioxidante;
3. Determinação dos efeitos da exposição subletal à deltametrina (10% da CL50(I);48h) por 96 horas sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral *in vivo*;
4. Avaliação dos efeitos da adição de deltametrina (na formulação comercial Keshet[®]) sobre a atividade da acetilcolinesterase cerebral de pacu *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais

Exemplares juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), de comprimento aproximado de 10 cm, foram doados, inicialmente, pelo Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, *campus* Jaboticabal/SP (CAUnesp). Como alguns peixes adoeceram e acabaram não respondendo ao tratamento com antibiótico, o número restante não foi suficiente para os experimentos propostos. Por essa razão, foi necessário um segundo lote de peixes; desta vez, doado pela Piscicultura Poletini, Mogi Mirim/SP. Os pacus saudáveis do primeiro lote foram então utilizados para os pré-testes de toxicidade aguda; o teste definitivo de toxicidade, assim como o experimento de exposição subletal, foram feitos com os animais do segundo lote. Os peixes, uma vez no Laboratório de Bioquímica Adaptativa, permaneceram em aclimatação e crescimento em tanques de 250 L, em sistema de circulação aberto, com aeração constante e temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Durante esse período, os animais receberam ração comercial contendo 32% de proteína bruta.

4.1.2 Reagentes

O inseticida Keshet[®] 25, cujo princípio ativo é a deltametrina ($25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), foi gentilmente doado pela empresa Milenia Agrociências S/A, Londrina/PR e utilizado nos experimentos. Glutaciona reduzida, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato formas reduzida (NADPH) e oxidada (NADP⁺), β -nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida (NADH) e adenosina difosfato (ADP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes eram de alto grau analítico.

4.1.3 Avaliação Ética

Toda a metodologia de experimentação e coleta de material biológico foi submetida, antes do início dos experimentos, à avaliação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, CEEA/UFSCar. O parecer de aprovação foi emitido na reunião de novembro de 2009, sob protocolo nº 052/2009.

4.2 Métodos

4.2.1 Estimativa da toxicidade aguda (CL(I)50;48h) de deltametrina (Keshet®)

A estimativa da toxicidade aguda de deltametrina para juvenis de *P. mesopotamicus* foi realizada com ensaios baseados nas recomendações da Norma ABNT NBR 15088 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2006). A finalidade desses experimentos foi encontrar uma concentração letal aproximada, como referência para posterior determinação de uma concentração subletal. Por esse motivo, foram consideradas desnecessárias algumas indicações da referida norma, como por exemplo, o teste de sensibilidade com cloreto de potássio.

Antes da realização do experimento definitivo, foram feitos pré-testes para estabelecer a menor concentração de deltametrina que causasse 100% de mortalidade. As diferentes concentrações testadas foram obtidas por diluições do produto comercial Keshet®, baseadas na concentração de ingrediente ativo.

Para o teste definitivo, seis peixes ($50,3 \text{ g} \pm 12,5 \text{ g}$; $13,3 \text{ cm} \pm 1,2 \text{ cm}$) foram transferidos para cada tanque de 250 L, no sistema de teste, e permaneceram em aclimatação por 15 dias. Após esse período, a circulação de água foi interrompida e o experimento conduzido em sistema estático, com aeração constante ($pO_2 = 5,4 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e temperatura controlada ($25,2^\circ\text{C}$).

Foram ensaiadas seis diferentes concentrações de deltametrina, baseadas nos dados obtidos nos testes preliminares: 10, 15, 20, 30, 40 e $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Um tanque permaneceu livre de deltametrina durante as 48 horas do teste, servindo como grupo controle. Os peixes não foram alimentados desde 24 horas antes do início até o final do período de teste.

A cada 24 horas, os animais mortos eram retirados e registrava-se a letalidade em cada concentração para posterior cálculo da CL(I)50;48h.

4.2.2 Exposição subletal a 10% da CL(I)50;48h de deltametrina (Keshet®)

Para o experimento de exposição subletal, 36 juvenis de pacu ($59,5 \text{ g} \pm 10,5 \text{ g}$; $14 \text{ cm} \pm 0,9 \text{ cm}$) foram igualmente divididos em seis tanques de 250 L, semelhantes àqueles utilizados no experimento de toxicidade aguda. Após um período de aclimatação de 15 dias, a circulação de água dos tanques foi interrompida e a alimentação foi suspensa até o fim do experimento.

O ensaio foi realizado, então, em sistema estático, com aeração constante ($5,4 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e temperatura controlada ($25,2^\circ\text{C}$). Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados diariamente e não sofreram alteração ao longo do experimento: pH (7,2), amônia ($0,3 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_3$), alcalinidade ($20,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCO}_3^+/\text{CO}_3^-$) e dureza ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3$). O experimento foi conduzido em triplicatas, sendo os tanques aleatoriamente definidos como grupo controle ou exposto.

Os três tanques definidos como expostos receberam um volume de solução de deltametrina (Keshet[®]) equivalente a 10% CL(I)50;48h. Os demais tanques permaneceram em água livre do xenobiótico. A duração da exposição subletal foi de 96 horas, e não houve reaplicação do produto contendo deltametrina.

Ao final do período de exposição subletal, cinco peixes de cada tanque foram coletados. Amostras de sangue foram coletadas por punção caudal, utilizando-se seringas escorvadas com EDTA 10% como anticoagulante. Os animais foram, então, mortos por secção medular, pesados, medidos e imediatamente dissecados para obtenção dos tecidos: brânquias, cérebro, fígado e músculo branco. As amostras de brânquias foram acondicionadas em microtubos contendo tampão SEI- β -mercaptoetanol (sacarose 0,3 M, EDTA 0,1 mM, imidazol 0,03 M, β -mercaptoetanol 5 mM, pH 7,4). Os tecidos e o plasma obtido após centrifugação do sangue foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C até as análises bioquímicas.

4.2.3 Determinação dos parâmetros de qualidade de água

Oxigênio, temperatura e pH

Os teores de oxigênio e a temperatura foram determinados eletrometricamente com oxímetro YSI-55. O pH foi determinado com um pHmetro Orion 710.

Dureza

Amostras de 100 mL da água de cada tanque foram utilizadas para determinação de dureza (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1980). As amostras foram inicialmente tamponadas em 2 mL de tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (dissolvidos 67,5 g de NH_4Cl em 570 mL de NH_4OH e completado para um litro com água destilada). Em seguida, acrescentaram-se oito gotas da solução indicadora de eriocromo negro T (4,5 g de $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ e 0,5 g de eriocromo negro T dissolvida em 100 mL de etanol). Esta solução era

então titulada com solução de EDTA 0,4 % (com $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 %) até o ponto de viragem de lilás para azul puro. Para o cálculo da dureza em mg CaCO_3/L foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Dureza} = (\text{mL de EDTA}) \times (1000) \times F / \text{vol. da amostra}, \text{ onde } F = 1,001.$$

Alcalinidade

As determinações de alcalinidade foram efetuadas segundo a técnica descrita por Goldstein e Clymo (1969), utilizando-se 100 mL de água de cada tanque. No procedimento, utilizou-se ácido sulfúrico 0,01 N como indicador de alcalinidade para titulação até pH 4,0. No cálculo da alcalinidade das amostras, em $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de carbonatos e bicarbonatos, foi utilizada a seguinte expressão:

Alcalinidade = $(\text{mL de } \text{H}_2\text{SO}_4) \times N \times 50000 / \text{vol. da amostra (mL)}$, sendo N = normalidade do ácido sulfúrico.

Amônia

A concentração de amônia nos tanques foi determinada por nesslerização segundo Gentzkow e Masen (1942) modificado. Eram adicionados 0,5 mL de reativo de Nessler a 2,0 mL de amostra de água de cada tanque. Após 20 minutos, a leitura óptica era realizada a 420 nm. A concentração de amônia foi estimada contra um padrão de amônia contendo 100 nmol.

4.2.4 Variáveis hematimétricas

Hematócrito

Para a determinação do hematócrito, microcapilares heparinizados foram preenchidos com amostras de sangue total, vedados com massa de modelar e centrifugados por três minutos a $12.000 \times g$. A porcentagem de sedimentação de eritrócitos foi lida em cartão padronizado.

Hemoglobina Total

A determinação de hemoglobina total foi feita segundo o método descrito por Drabkin (1948), que se baseia na oxidação da hemoglobina por ferricianeto de potássio e na reação do

composto resultante com cianeto de potássio, formando um complexo estável, a cianometahemoglobina, de intensidade de coloração proporcional ao teor de hemoglobina no sangue. Foram utilizados 10 µL de sangue total de cada peixe, diluídos em 2 mL de solução de Drabkin (KCN 0,5 g, KH₂PO₄ 1,4 g e K₃(FeCN)₆ 2 g dissolvidos em 1,0 L de H₂O_{dest}). Após homogeneização, mediu-se a densidade óptica em 540 nm, contra um branco contendo apenas a solução de Drabkin. Os valores de hemoglobina total foram então determinados pela seguinte expressão:

$$\text{Hb total (gHb/dL)} = [\text{densidade óptica}_{540\text{nm}} \times 1,6114] / 11 \times \text{diluição}$$

Contagem de eritrócitos (RBCC)

A contagem de eritrócitos foi feita diluindo-se 10 µL de sangue total em 2 mL de solução de citrato-formol (1,9 g de citrato de sódio e 1 mL de formaldeído 40% diluídos em 50 mL de H₂O_{dest}). Desta mistura, foram utilizados 10 µL para a contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio óptico. Os eritrócitos foram contados em cinco grupos de quadrados, que são subdivididos em 16 quadrados menores, totalizando assim, 80 quadrados menores. Os valores foram obtidos através da soma dos eritrócitos nos cinco quadrados maiores, que equivalem a 1/5 de 0,1 mm³; os valores foram convertidos para milhões por mm³, levando em conta a diluição (LIMA *et al.*, 1969).

Índices hematológicos

Os índices hematológicos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados segundo as seguintes expressões:

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

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

$$\text{CHCM } (\%) = [\text{Hb}_{\text{total}} (\text{g}\%) / \text{Hematócrito } (\%)] \times 100$$

4.2.5 Íons plasmáticos

Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺)

As concentrações de Na^+ e de K^+ foram determinadas por fotometria de chama (Digimed DM-61) em plasma total diluído cem vezes, contra um padrão contendo $140 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na^+ e $5 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ de K^+ .

Cloreto (Cl)

O cloreto plasmático foi quantificado segundo metodologia da American Public Health Association (1980). Alíquotas de $100 \mu\text{L}$ de plasma diluído cem vezes eram adicionados a $2,5 \text{ mL}$ de um reagente composto por três partes de uma solução de tiocianato de mercúrio $0,09\%$ em etanol P.A. (solução A) e dez partes de uma solução de nitrato de ferro 6% em ácido nítrico $0,4 \text{ M}$ (solução B). A leitura óptica era realizada em 480 nm , contra um padrão de 100 nmol de cloreto de sódio.

4.2.6 Determinações dos intermediários metabólicos em tecidos e plasma

As concentrações de ácidos graxos livres, aminoácidos livres, amônia, glicose, lactato, piruvato, proteína e triacilgliceróis foram determinadas em extrato celular obtido tal como descrito a seguir. Amostras de 50 mg de fígado e de 100 mg de músculo branco foram homogeneizadas em 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% (extrato ácido) ou em água destilada (extrato neutro) utilizando um homogeneizador tipo Ultra-Turrax IKA® T10 Basic a 4.000 rpm por um minuto sob banho de gelo. O homogeneizado era centrifugado por três minutos a $12.000 \times g$ e, o sobrenadante era utilizado para as determinações dos intermediários metabólicos. Nas determinações plasmáticas eram utilizados $100 \mu\text{L}$ de plasma em $900 \mu\text{L}$ de TCA 20% , ou o plasma total. Para a determinação de glicogênio, o homogeneizado celular foi obtido como descrito no item 4.2.6.9.

4.2.6.1 Ácidos graxos livres (AGL)

As concentrações de ácidos graxos livres foram determinadas segundo Milan (1965). Eram adicionados 1 mL de solução extratora Dole (heptano, álcool isopropílico e ácido sulfúrico 1N na proporção de $1:4:0,1$) a alíquotas de homogeneizados neutros e ao plasma ($400 \mu\text{L}$ do homogeneizado de músculo branco e $100 \mu\text{L}$ do homogeneizado de fígado), seguido de agitação em vórtex por 20 segundos. Posteriormente, era adicionado 1 mL de heptano e um volume de água suficiente para completar 3 mL , agitando-se novamente por inversão lenta. Após centrifugação por três minutos a $3.000 \times g$, $600 \mu\text{L}$ da fase superior eram retirados e adicionados a $800 \mu\text{L}$ de uma mistura de clorofórmio e heptano ($5:1$). Adicionava-

se então, a cada tubo, 1 mL de reagente cobalto, que é constituído por 1,32 volumes de trietanolamina + 10 volumes de solução A (solução saturada de K_2SO_4 , 6g de nitrato de cobalto e 0,8mL de ácido acético glacial) + 7 volumes de solução B (solução saturada de Na_2SO_4). As amostras eram fortemente agitadas em vortex por trinta segundos e, posteriormente, centrifugadas por três minutos a 3000 x g. Da fase superior, era retirada uma alíquota de 600 μ L à qual eram adicionados 600 μ L de solução indicadora (0,4% de α -nitroso- β -naftol em etanol, diluído 12,5 vezes). Após cinco minutos, a leitura óptica era realizada em 500 nm contra um padrão de ácido palmítico 4 mM.

4.2.6.2 Aminoácidos livres

A determinação de aminoácidos livres foi feita segundo o método de Copley (1941). Dos homogeneizados neutros, foram utilizadas alíquotas de 25 μ L para músculo branco e 20 μ L para fígado. No plasma, essa análise não pôde ser realizada por interferência do EDTA utilizado como anticoagulante. Após a transferência das alíquotas para um tubo, adicionava-se 2 mL de ninhidrina 0,1% em propanol. Os tubos eram vedados e colocados em banho-maria a 40°C, por 40 minutos. Após esse período, a leitura óptica das amostras era realizada em 570 nm, contra um padrão de glicina 10 mM.

4.2.6.3 Amônia

Alíquotas dos extratos ácidos (50 μ L, 50 μ L e 300 μ L dos extratos ácidos de músculo branco, fígado e plasma, respectivamente), foram transferidas para um tubo com água destilada em um volume final de 2 mL, com posterior adição de 0,5 mL de reativo de Nessler (GENTZKOW; MASEN, 1942). Após 20 minutos, a leitura óptica foi realizada em 420 nm, contra um padrão de cloreto de amônio 100 nmol.

4.2.6.4 Glicose

Para a determinação das concentrações de glicose foi utilizado o Kit LabTest[®] cuja determinação segue o método enzimático de Glicose Oxidase (TRINDER, 1969). Em duplicatas, 10 μ L de plasma puro, 20 μ L do extrato neutro de músculo branco e 5 μ L do extrato neutro de fígado foram pipetados em uma microplaca, juntamente com um volume suficiente para completar 200 μ L do reagente que acompanha o Kit. Após incubação a 37°C por dez minutos, a leitura do material foi feita em 525 nm, contra uma curva padrão de glicose.

4.2.6.5 Lactato

Essa estimativa foi feita em extrato ácido, de acordo com Harrower e Brown (1972). Foram utilizados 25 μL do homogeneizado de músculo branco e 50 μL dos homogeneizados de fígado e plasma. A esses volumes de extrato eram adicionados 20 μL de CuSO_4 a 4% e 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação e incubação por cinco minutos a 100°C , eram adicionados 80 μL de p-fenilfenol (1,5 g de p-fenilfenol em solução aquosa de NaOH 2%). A mistura era agitada em vortex e permanecia em repouso. Após uma hora, os tubos eram fervidos por 90 segundos e imediatamente resfriados em banho de gelo. A leitura ótica era realizada a 570 nm, contra um padrão de lactato.

4.2.6.6 Piruvato

Esse intermediário também foi determinado em extrato ácido, segundo o método descrito por Lu (1939). Eram utilizados 500 μL dos extratos de músculo branco, fígado e plasma. A essas amostras adicionava-se 250 μL de dinitrofenilhidrazina 0,1% em HCl 2 N. Após 30 minutos de incubação a 37°C , eram adicionados 3 mL de NaOH 1,3 N e a leitura ótica era efetuada em 440 nm, contra um padrão de piruvato contendo 100 nmol.

4.2.6.7 Proteína

A quantidade de proteína total foi feita pelo método descrito por Kruger (1994), utilizando-se o reagente de Bradford (100 mL de ácido fosfórico 85%, 50 mL de etanol 95%, 100 mg de “Comassie Brilliant Blue”, completados para um litro; a mistura é filtrada duas vezes e armazenada a 4°C em frasco escuro).

Depois de feitas as diluições apropriadas do homogeneizado neutro de cada tecido (1:100 (v:v) de plasma e músculo branco e 1:50 (v:v) de fígado), 10 μL de cada diluição eram adicionados aos poços de uma microplaca, em duplicatas; em seguida, 190 μL de reagente de Bradford eram adicionados em cada amostra. A microplaca era incubada no escuro, à temperatura ambiente, por dez minutos, e depois, lida a 620 nm, contra um padrão de albumina sérica bovina (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

4.2.6.8 Triacilgliceróis (TGL)

A quantificação de triacilglicerídeos foi feita com o Kit Liquiform[®], cujas reações baseiam-se no método enzimático da lipoproteína lipase (TRINDER, 1969). Nos poços de

uma microplaca eram colocados, em duplicata, 10 μL e 20 μL dos extratos neutros de fígado e músculo branco, respectivamente, e 10 μL de plasma puro, juntamente com volume adequado do reativo que acompanha o Kit, suficiente para completar 200 μL . A placa era incubada a 37°C por dez minutos. A leitura era feita a 525 nm, contra um padrão de triglicérides que acompanha o Kit.

4.2.6.9 Glicogênio

As determinações de glicogênio foram realizadas como descrito por Bidinotto e colaboradores (1997). Cem miligramas de músculo branco e cinquenta miligramas de fígado eram transferidas para tubos de ensaio e adicionados de 1 mL de KOH 6 N. Posteriormente, os tubos eram incubados a 100 °C por cinco minutos até a dissolução dos tecidos. Dessa mistura, 250 μL eram transferidos para outro tubo e adicionados de 3 mL de etanol PA e 100 μL de K_2SO_4 . Os tubos eram vigorosamente agitados em vortex e então centrifugados a 3.000 $\times g$ por três minutos. O sobrenadante era descartado por inversão do tubo e o precipitado era resuspenso em 2,5 mL de água destilada. Dessa dissolução eram retirados 500 μL (das amostras de músculo branco) e 50 μL (das amostras de fígado) para determinação do teor de açúcares redutores totais pelo método de Dubois e colaboradores (1956). A concentração de glicogênio está expressa em μmol de glicosil-glicose $\cdot\text{g}$ de tecido $^{-1}$.

4.2.7 Glutathiona reduzida hepática (GSH)

A concentração de GSH hepática foi determinada segundo Beutler (1984) modificado. Amostras de 50 mg de fígado eram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0, e centrifugadas a 12.000 $\times g$ por três minutos, a 4°C. Do sobrenadante, 300 μL eram transferidos para microtubos, completados para 0,5 mL com água destilada e adicionados 0,75 mL de solução de precipitação (1,67 g de ácido metafosfórico, 0,2 g de EDTA e 30 g de NaCl em 100 mL de água destilada). Posteriormente, a suspensão era centrifugada a 12.000 $\times g$ por 3 minutos em temperatura ambiente. Quinhentos microlitros do sobrenadante eram retirados para a determinação da concentração de glutathiona reduzida. Ao volume do sobrenadante eram adicionados 2 mL de solução de fosfato de sódio dibásico 0,3 M, pH 8,0 e a leitura óptica era realizada em 412 nm contra um branco contendo água. Após esta leitura era adicionado 0,25 mL de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis- 2- nitrobenzóico), e depois de 10 minutos era feita nova leitura, também a 412 nm. A concentração de glutathiona reduzida foi determinada contra um padrão de glutathiona reduzida contendo 100 nmol.

4.2.8 Determinações enzimáticas

4.2.8.1 Enzimas do metabolismo intermediário

Para a determinação das atividades de transaminases, piruvato quinase e glutamato desidrogenase, amostras de 50 mg de fígado e de 200 mg de músculo branco foram homogeneizadas em 1 mL de tampão de homogeneização (fosfato de sódio 20 mM; glicerina 1:1 (v:v) pH 7,0), em banho de gelo, utilizando um homogeneizador do tipo Ultra-Turrax, sob baixa velocidade. Os homogeneizados eram então centrifugados, a 4°C, duas vezes (600 \times g por 3 minutos; 6000 \times g por 8 minutos) e o sobrenadante final era utilizado para os ensaios enzimáticos e para determinação de proteínas totais, para posterior cálculo das atividades específicas.

O coeficiente de extinção molar, em 340 nm, do NADH utilizado para os cálculos das atividades das enzimas do metabolismo intermediário foi $0,8551 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,

a. Transaminases

As atividades da alanina aminotransferase (ALAT) e da aspartato aminotransferase (ASAT) foram medidas, cineticamente, nos homogeneizados de músculo branco e fígado, segundo o método de Bergmeyer e colaboradores (1978). Foram utilizados, respectivamente, os Kits ALT/GPT e AST/GOT Liquiform da Labtest®.

A reação da ALAT baseia-se na conversão de alanina em piruvato por transaminação, seguida da sua redução a lactato por lactato desidrogenase (LDH) exógena, determinando-se a extinção do NADH em 340 nm. A mistura de reação para a ALAT continha: Tampão Tris 135,5 mM, pH 7,5; alanina 687,5 mM; α -cetoglutarato 82,5 mM; NADH 1,32 mM; LDH 2,3 U/mL e volume adequado do sobrenadante.

Já a reação da ASAT baseia-se na conversão de aspartato em oxalacetato por transaminação, seguido de sua redução a malato por malato desidrogenase (MDH) exógena, determinando-se a extinção do NADH em 340 nm. A mistura de reação para a ASAT continha: Tampão Tris 105 mM, pH 7,8; aspartato 330 mM; α -cetoglutarato 66 mM; NADH 1,32 mM; MDH 0,82 U/mL; LDH 1,2 U/mL e volume adequado do sobrenadante.

b. Piruvato Quinase (PK)

A atividade da piruvato quinase foi ensaiada em fígado e músculo branco, de acordo com Staal, Koster e Vegger (1975). O princípio da reação baseia-se na conversão de

fosfoenolpiruvato em piruvato, seguida de sua redução a lactato através de LDH exógena, com acompanhamento da extinção de NADH. O coquetel de reação era composto por: Tampão HEPES 100 mM, pH 7,5, fosfoenolpiruvato 2,8 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 100 mM, NADH 0,15 mM, LDH 21 U/mL e ADP 2,5 mM. Foram utilizados 20 µL do sobrenadante puro de fígado e 10 µL do sobrenadante de músculo branco, diluído dez vezes.

c. Glutamato desidrogenase (GDH)

A atividade enzimática da GDH foi determinada nos homogeneizados de músculo branco segundo Hochachka *et al.* (1978). O princípio da reação baseia-se na redução de α -cetogluturato em glutamato, acompanhada pela extinção em paralelo de NADH. O coquetel de reação continha: Tampão imidazole 50 mM, pH 7,0, acetato de amônio 250 mM, α -cetogluturato 5 mM, NADH 0,1 mM e ADP 1 mM. Foram utilizados 200 µL do sobrenadante puro de músculo branco.

4.2.8.2 Enzimas antioxidantes hepáticas

Para determinação das atividades da catalase (CAT), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), seguiu-se os métodos descritos por Beutler (1984). Amostras de 50 mg de fígado foram homogeneizadas em 500 µL de solução-tampão fosfato de potássio 0,1 M-sacarose 0,25 M, pH 7,0. Após homogeneização em homogeneizador tipo Ultra-Turrax, sob banho de gelo e em baixa velocidade, as amostras eram centrifugadas a 15.000 \times g, por dez minutos. O pellet era descartado e o sobrenadante, utilizado para as determinações enzimáticas e de conteúdo de proteínas totais pelo método de Kruger (1994) como descrito para os intermediários metabólicos.

a. Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi ensaiada cineticamente em 230 nm, monitorando-se a diminuição na concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os homogeneizados eram diluídos 200 vezes em tampão de homogeneização fosfato-sacarose. Após a diluição, eram adicionados 20 µL de etanol PA para impedir a reversão da atividade da enzima.

Para fazer a solução de substrato era necessária a determinação da concentração exata da solução-estoque de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para isso, após zerar o espectrofotômetro com água destilada, eram adicionados a uma cubeta de passo óptico de 1 cm, 1,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 e realizada a leitura óptica em 230 nm

(DO₁). Após essa leitura, eram adicionados à mesma cubeta, 200 µL do H₂O₂ estoque diluída 100 vezes, e uma nova leitura era feita (DO₂). O cálculo da concentração baseou-se na subtração (DO₂-DO₁) multiplicada por 141, dado que o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do H₂O₂ é 0,071 e o volume final da cubeta era de 2 mL. Sabendo-se a concentração da H₂O₂ estoque, era possível diluí-la para a concentração de substrato desejada.

A atividade específica da CAT era então determinada adicionando-se em uma cubeta de quartzo de passo óptico de 1 cm: 100 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5, 1800 µL de H₂O₂ 22,2 mM (preparada em tampão de reação), 40 µL de sobrenadante diluído e 60 µL de água destilada. A mistura era incubada por um minuto, em reação cinética, com registros da DO₂₃₀ a cada dez segundos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi $\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

b. *Glutathione peroxidase (GPx)*

A determinação da atividade específica da GPx hepática baseou-se na reação da glutathione redutase e da oxidação do NADPH, utilizando t-butil hidroperóxido como substrato.

Eram adicionados à cubeta de passo óptico de 1 cm: 100 µL de solução-tampão tris/HCl 1 M – EDTA 5 mM pH 7,7; 20 µL de glutathione reduzida 0,1 M; 100 µL de glutathione redutase 10 U·mL⁻¹; 100 µL de NADPH 2 mM; 380 µL de azida sódica 2,6 µM; 10 µL de sobrenadante diluído 200 vezes e 260 µL de água destilada. Essa solução era pré-incubada por 2 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, eram adicionados 30 µL de t-butil hidroperóxido 7 mM. A oxidação do NADPH era determinada durante um minuto, com registros a cada dez segundos, e o decréscimo da densidade óptica era determinado contra um branco a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

c. *Superóxido dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi determinada segundo o princípio de auto-oxidação do pirogalol, a qual é inibida na presença da SOD.

Em uma cubeta de 3 mL eram adicionados 200 µL de solução-tampão Tris/HCl 1 M - EDTA 5 mM, pH 7,7, e um gradiente de volumes do sobrenadante de fígado (de 10 a 50 µL), completando-se o volume de reação para 1960 µL com água destilada. As amostras eram pré-incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos e então, adicionados 40 µL de pirogalol 10

mM preparado em solução de HCl 10 mM. A variação da densidade óptica era determinada cineticamente por dois minutos a 420nm, em intervalos de dez segundos. A atividade da SOD foi estimada considerando-se uma unidade (1 U) como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da auto-oxidação do pirogalol.

d. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi determinada através da reação de redução do NADP⁺. Foram utilizados 10 µL do sobrenadante puro e, para cada amostra, foi feito também um branco de substrato.

A atividade específica era determinada em ensaio cinético, em cubeta de passo óptico de 1 cm, contendo 880 µL de um coquetel (com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, MgCl₂ 0,01 mM e NADP⁺ 0,2 mM), 40 µL de sobrenadante e 30 µL de água destilada. A reação ocorria a partir da adição de 50 µL de glicose-6-fosfato 0,1 M. Nas amostras de branco de substrato não era adicionada glicose-6-fosfato. O volume era completado para 1 mL com água destilada. A produção de NADPH era determinada a 340 nm por um minuto, com registros a cada dez segundos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.8.3 Acetilcolinesterase cerebral (AChE)

Nas determinações de AChE cerebral, alíquotas de 25 mg de cérebro eram homogeneizadas em 500 µL de tampão de homogeneização (fosfato de sódio 20 mM; glicerina 1:1 (v/v) pH 7,0). As amostras eram homogeneizadas a baixa velocidade em homogeneizador tipo Ultra-Turrax, sob banho de gelo. Em seguida, eram centrifugados a 12000 $\times g$ por três minutos a 4°C. O sobrenadante (enzima) era utilizado na determinação da atividade enzimática e da concentração de proteínas totais, para posterior cálculo da atividade específica.

O ensaio da atividade da AChE foi feito segundo o método de Ellman *et al.* (1961), que se baseia na taxa de produção de tiocolina a partir de acetiltiocolina hidrolisada por ação da AChE. Essa hidrólise é acoplada à reação contínua do tiol formado com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB); forma-se então, o ânion ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de coloração amarela. A taxa de formação de TNB é medida a 412 nm ao longo do tempo de reação.

O meio de reação continha em volume final de 1,0 mL: solução-tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5; 0,32 mM de DTNB, preparado em tampão de reação; 0,18 mM de acetilcolina e 10 µL de enzima (25 mg de cérebro em 500 µL de tampão de homogeneização). O coeficiente de absorvidade molar utilizado nos cálculos foi o do ácido tionitrobenzólico ($\epsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.2.8.4 Sódio-Potássio ATPase Branquial (Na^+/K^+ -ATPase)

A atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase branquial foi determinada seguindo a metodologia de Quabius, Blam e Bonga (1997). O método consiste em quantificar o fosfato inorgânico (Pi) liberado devido à hidrólise de ATP, pelo funcionamento normal da bomba. A concentração basal de Pi é descontada ao incubar-se as amostras na presença de oubaína, um inibidor da Na^+/K^+ -ATPase.

Amostras de 100 mg de filamentos branquiais eram homogeneizados, em banho de gelo, em 500 µL de tampão SEI- β -mercaptoetanol, adicionado de Triton-X 0,1%, utilizando um homogeneizador do tipo Ultra-Turrax. Após centrifugação a $12000 \times g$ por cinco minutos, 10 µL do sobrenadante de cada amostra eram pipetados em seis poços de uma microplaca. Em cada poço, eram então adicionados, em triplicatas, 100 µL do tampão de incubação (NaCl 250 mM, MgCl_2 10 mM, imidazol 10 mM, EDTA 0,1 mM, ATP 3mM, pH 7,6) contendo oubaína 2,5 mM ou KCl 20 mM. Após 30 minutos de incubação no escuro e em temperatura ambiente, a reação era interrompida pela adição de 200 µL do reagente de cor (solução 1:1 (v:v) de TCA 8,6% e de H_2SO_4 0,66 mM, molibdato de amônia 9,2 mM e FeSO_4 0,33 mM, na proporção 1:1) e a leitura, realizada em 595 nm, contra um padrão de fosfato inorgânico ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

4.2.9 Peroxidação lipídica

A extensão da peroxidação lipídica foi ensaiada pelo método de Jiang, Woollard e Wolff (1991). O método é conhecido como FOX (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange) e se baseia na oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} por hidroperóxidos celulares, em meio ácido, na presença de um pigmento complexador de Fe^{3+} , o alaranjado de xilenol. O Fe^{3+} formado por ação de hidroperóxidos solubilizados na amostra reage com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido que tem pico de absorção em 560 nm.

Em média, 50 mg de fígado eram homogeneizados em metanol P.A., utilizando-se um homogeneizador do tipo Ultra-Turrax, sob banho de gelo e a baixa velocidade. Após

centrifugação a $12.000 \times g$ por cinco minutos a 4°C , $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante eram incubados por 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com $900 \mu\text{L}$ da mistura reativa (alaranjado de xilenol $100 \mu\text{M}$, butilhidroxitolueno 4 mM , H_2SO_4 25 mM , FeSO_4 $250 \mu\text{M}$, diluídos, na ordem apresentada, em metanol 90%). A leitura óptica era realizada em 560 nm . Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de absorvidade encontrado pelos autores do método para uma curva de hidroperóxido de cumeno ($\epsilon = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.3 Avaliação estatística

A determinação da CL(I)50;48h foi feita através do método Trimmed Spearman-Kärber, utilizando o software “LC50 Programs JSPEAR”, com 95% de confiança (HAMILTON; RUSSI; THURSTON, 1977).

Os conjuntos de dados obtidos no experimento de exposição subletal, de índices hematológicos, intermediários metabólicos, glutatona reduzida, peroxidação lipídica e atividades enzimáticas foram avaliados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todos os dados avaliados mostraram distribuição normal e as médias dos grupos controle e exposto foram então comparadas pelo teste t de Student, adotando nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Estimativa da toxicidade aguda $CL_{(I)50;48h}$ de deltametrina (Keshet[®]) para juvenis de pacu

O valor estimado da $CL_{(I)50;48h}$ de deltametrina na formulação comercial Keshet[®] para juvenis de *Piaractus mesopotamicus* foi de $17,32 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, com limite inferior de $14,34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e limite superior de $20,92 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ambos com 95% de confiança.

Não se observou mortalidade nos grupos controle e $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante todo o experimento. Nos demais tanques de exposição, foi registrada mortalidade a partir de doze horas após a adição do inseticida na água. Após 24 horas, as taxas de mortalidade foram: 33,33% na concentração $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 66,66% em $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 100% nas demais concentrações. Quarenta e oito horas após o início do experimento, a mortalidade aumentou apenas na concentração $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, a qual passou para 83,33%. Esses dados estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Mortalidade de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* expostos à deltametrina (Keshet[®]).

Concentração de deltametrina ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	N _{inicial}	N _{final}	Mortalidade (%)
0	6	6	0
10	6	6	0
15	6	4	33,33
20	6	1	83,33
30	6	0	100
40	6	0	100
50	6	0	100

Fonte: A própria autora.

Além da mortalidade, foram registradas alterações comportamentais durante o teste de toxicidade aguda. Os peixes do grupo controle não apresentaram alterações de comportamento durante todo o experimento, permanecendo, na maior parte do tempo, na porção inferior da caixa e agrupados em algum dos cantos quando notavam aproximação de observador. Os peixes expostos apresentaram alterações comportamentais poucas horas após a aplicação do xenobiótico. Nas concentrações intermediárias de deltametrina ($10, 15$ e $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), os peixes posicionavam-se no meio da coluna d'água e eram pouco ativos. Nas

maiores concentrações, os peixes apresentavam sinais claros de intoxicação, tais como desequilíbrio corporal, natação errática e/ou lateral e batimento opercular acelerado, culminando com a morte em menos de 24 horas após a aplicação do xenobiótico.

5.2 Exposição subletal a 10% da $CL_{(1)}50;48h$ de deltametrina (Keshet[®])

Não foi registrada mortalidade durante a exposição a $1,73 \mu\text{g L}^{-1}$ de deltametrina em nenhum dos tanques do grupo controle ou exposto. Os resultados a seguir, na forma de tabelas ou gráficos de barras, estão representados como médias e desvios padrão das variáveis ensaiadas e foram comparados unicamente com seus controles para quaisquer conclusões de diferença significativa.

5.2.1 Variáveis hematimétricas

Os dados hematológicos e os índices hematimétricos estão apresentados na Tabela 2. Após a exposição subletal, os valores de hematócrito e a contagem de eritrócitos (RBCC) apresentaram queda significativa de 8,2% e 12%, respectivamente. Conjuntamente, os valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentaram aumento de 15%. Já os valores de hemoglobina total, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram diferença significativa.

Observou-se um aumento significativo de 5% na concentração de sódio e de 3,2% na de cloreto. Não houve alteração significativa dos teores de potássio.

Tabela 2 - Variáveis hematimétricas de pacu exposto a concentração subletal de deltametrina (Keshet®).

Variável	Controle	Exposto
Hematócrito (%)	25,7 ± 2,4	23,6 ± 1,7*
Hb total (g.dL ⁻¹)	6,8 ± 1,3	6,9 ± 0,9
RBCC (10 ⁶ células.mm ⁻³)	2,5 ± 0,3	2,2 ± 0,3*
VCM (µm ³)	103,5 ± 16,2	108,7 ± 22
HCM (pg.célula ⁻¹)	27,2 ± 6,1	31,3 ± 5,7*
CHCM (g.dL ⁻¹)	26,5 ± 5,2	29,1 ± 3,7
Na ⁺ (mEq.L ⁻¹)	203 ± 15,3	214 ± 12,5*
K ⁺ (mEq.L ⁻¹)	3 ± 0,9	2,7 ± 0,2
Cl ⁻ (mEq.L ⁻¹)	112 ± 4,3	115,6 ± 2,8*

Os dados são apresentados como média ± (DP). Diferença significativa é sempre indicada (*) em relação ao controle para p < 0,05.

Fonte: A própria autora.

5.2.2 Intermediários metabólicos e enzimas do metabolismo intermediário em tecidos e plasma

Os dados das variáveis metabólicas avaliadas em fígado, músculo branco e plasma dos peixes submetidos à exposição subletal ao inseticida contendo deltametrina estão apresentados na Tabela 3.

No fígado observou-se queda significativa de ácidos graxos livres (21,4%), glicose (23,8%) e glicogênio (23,2%). Observou-se um aumento de 13% na concentração de proteínas totais. Os demais intermediários metabólicos não apresentaram alterações, bem como as atividades das enzimas analisadas.

No músculo branco, foram observados aumento de 21,6% de piruvato, redução de 7,3% de proteína e redução de 15,8% de glicose. Quanto às enzimas, houve redução de aproximadamente 20% na atividade da PK. As demais enzimas ensaiadas apresentaram aumentos significativos: ALAT 20%, ASAT 43% e GDH 48%.

No plasma observou-se aumento de 14,3% na concentração de glicose e de 8,8% de proteína.

Tabela 3 - Intermediários metabólicos e enzimas do metabolismo intermediário de fígado, músculo branco e plasma de pacu após exposição subletal à deltametrina (Keshet®).

Variável	Fígado		Músculo Branco		Plasma	
	Controle	Exposto	Controle	Exposto	Controle	Exposto
Amônia	12,6 ± 4,2	11,5 ± 4,3	6,9 ± 1,1	6,9 ± 1,6	0,58 ± 0,13	0,59 ± 0,12
Proteína	348,3 ± 43,8	393,6 ± 43,6*	59 ± 4,6	54,7 ± 5,7*	33,1 ± 2,2	35,7 ± 4,6*
Aminoácidos	70,6 ± 16,4	68,9 ± 26,1	16,4 ± 2,6	17,3 ± 3	-----	-----
ALAT	0,95 ± 0,39	0,79 ± 0,29	0,075 ± 0,017	0,096 ± 0,018*	-----	-----
ASAT	3,17 ± 0,66	3,04 ± 0,63	1,53 ± 0,41	2,19 ± 0,69*	-----	-----
GDH	-----	-----	0,028 ± 0,007	0,042 ± 0,013*	-----	-----
Glicose	22 ± 6,6	17,2 ± 3,9*	0,35 ± 0,06	0,29 ± 0,06*	0,41 ± 0,07	0,46 ± 0,06*
PK	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,02	11,46 ± 3,01	9,56 ± 2,45*	-----	-----
Piruvato	0,74 ± 0,09	0,70 ± 0,11	0,35 ± 0,13	0,43 ± 0,13*	0,32 ± 0,05	0,30 ± 0,05
Lactato	5,1 ± 1,3	5,8 ± 1,5	32,4 ± 4,2	32 ± 5,7	3,1 ± 1,8	2,6 ± 1,1
AGL	16,5 ± 4,6	12,9 ± 7,3*	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,4	-----	-----
TGL	3,3 ± 0,7	3,2 ± 1,2	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3	0,88 ± 0,25	0,80 ± 0,40
Glicogênio	240,2 ± 75,2	184,3 ± 23,5*	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,6	-----	-----

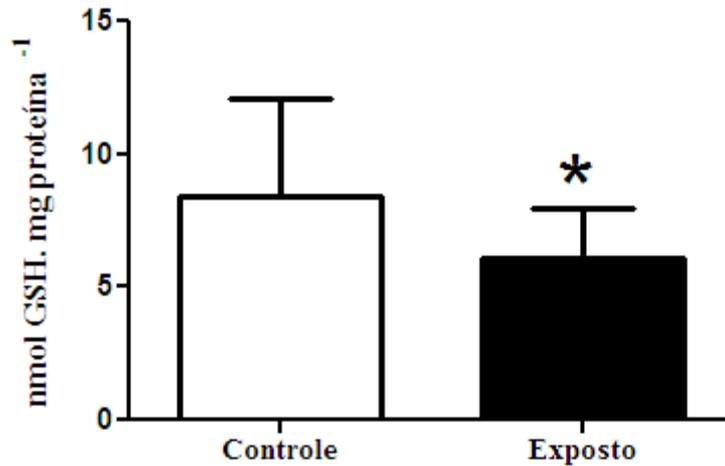
ALAT = alanina aminotransferase, ASAT = aspartato aminotransferase, AGL = ácidos graxos livres, GDH = glutamato desidrogenase, PK = piruvato quinase, TGL = triacilgliceróis. As concentrações de proteína, glicose e TGL estão expressas em mg·g de tecido⁻¹ ou mg·mL de plasma⁻¹; as concentrações de glicogênio estão expressas em μmol de glicosil-glicose·mg de tecido⁻¹; os demais intermediários estão expressos em μmol·g de tecido⁻¹ ou μmol·mL de plasma⁻¹. A atividade de GDH está expressa em nmol·min⁻¹·mg proteína⁻¹; as atividades das demais enzimas estão expressas em μmol·min⁻¹·mg de proteína⁻¹. Os dados são apresentados como média ± DP de 15 peixes por tratamento. Diferença significativa é sempre indicada (*) em relação ao controle para p < 0,05.

Fonte: A própria autora.

5.2.3 Antioxidante não-enzimático GSH (glutathiona reduzida)

Os teores de GSH hepática diminuíram 28,2% devido à exposição à deltametrina. Os dados estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Glutathiona reduzida hepática (nmol·mg proteína⁻¹) de pacus expostos à deltametrina por 96 h.



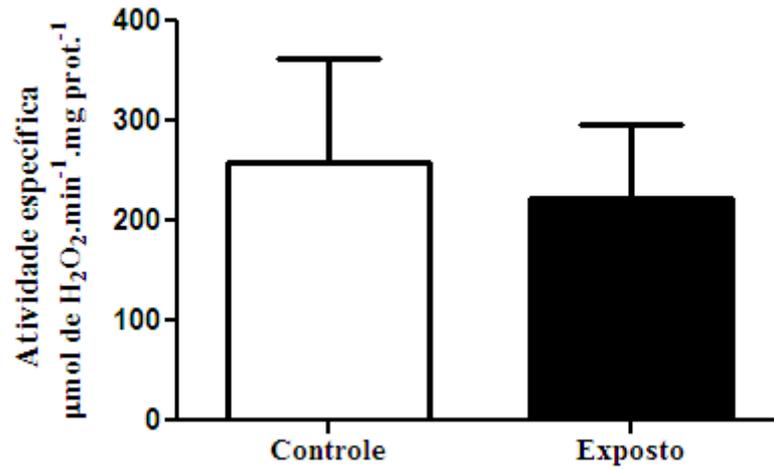
(*) indica diferença significativa entre os grupos, com $p < 0,05$.

Fonte: A própria autora.

5.2.4 Enzimas antioxidantes

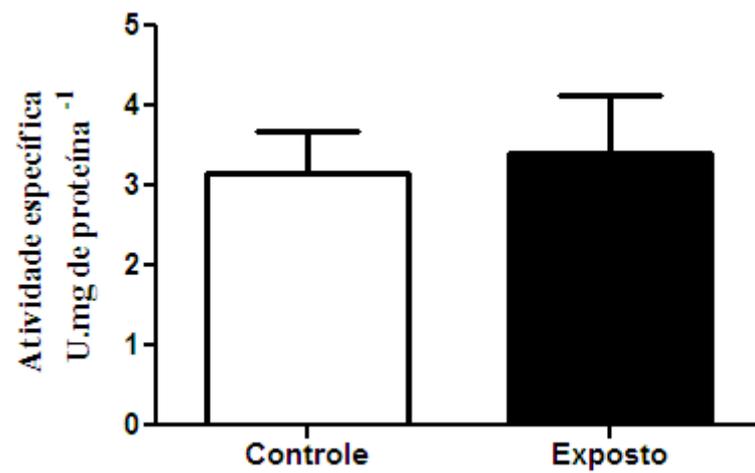
Não houve diferença nas atividades específicas de CAT e de SOD. Os dados estão apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. A atividade de GPx (Figura 8) apresentou queda de 32%, enquanto a de G6PDH (Figura 9) aumentou 38% após exposição à deltametrina.

Figura 6 - Atividade específica de catalase (CAT) hepática de pacus expostos à deltametrina por 96 h.



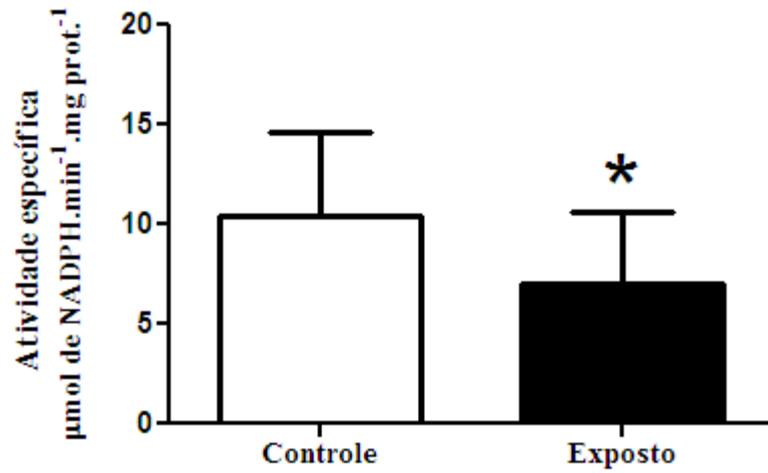
Fonte: A própria autora.

Figura 7 - Atividade específica de superóxido dismutase hepática (SOD) de pacus expostos à deltametrina por 96 h.



Fonte: A própria autora.

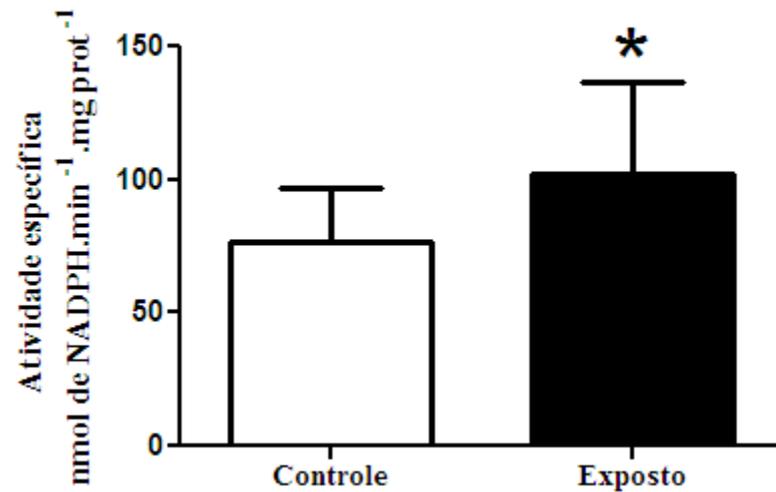
Figura 8 - Atividade específica da glutathiona peroxidase (GPx) hepática de pacus expostos à deltametrina por 96 h.



(*) indica diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$.

Fonte: A própria autora.

Figura 9 - Atividade específica da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) hepática de pacus expostos à deltametrina por 96 h.



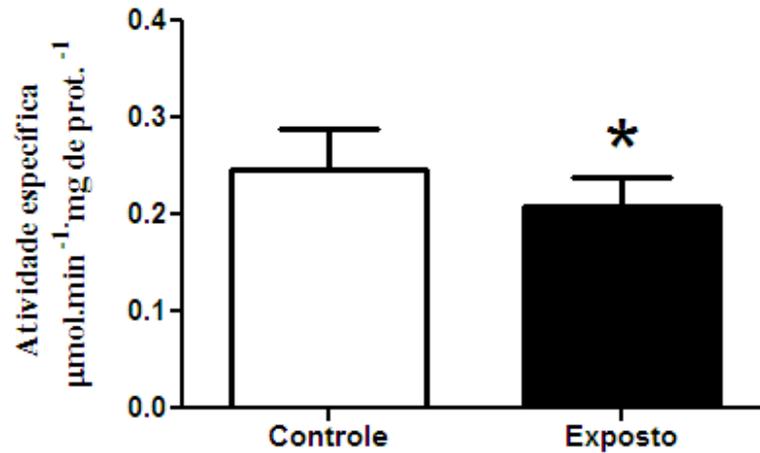
(*) indica diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$.

Fonte: A própria autora.

5.2.5 Acetilcolinesterase (AChE)

Observou-se diminuição de 11,6% na atividade específica de AChE cerebral de pacus após exposição à deltametrina (Figura 10).

Figura 10 - Atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) cerebral de pacus expostos à deltametrina por 96 h.

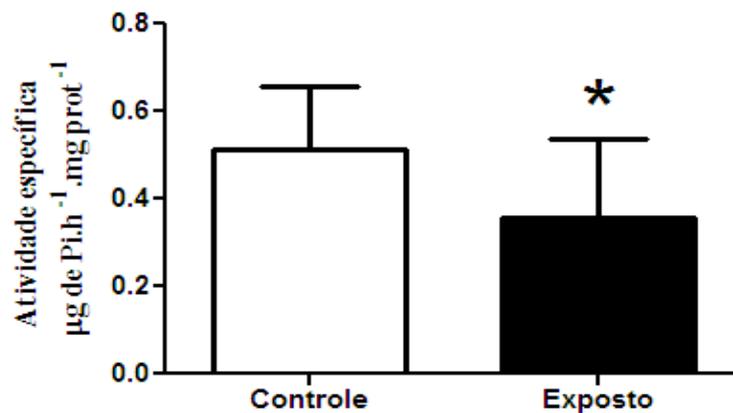


(*) indica diferença significativa entre os grupos, para $p < 0,05$.
Fonte: A própria autora.

5.2.6 Sódio-potássio ATPase (Na^+/K^+ -ATPase)

Observou-se redução de 37% na atividade específica de Na^+/K^+ -ATPase das brânquias de pacu após exposição à deltametrina por 96 h (Figura 11).

Figura 11 - Atividade específica de sódio-potássio ATPase branquial de pacus expostos à deltametrina por 96 h.

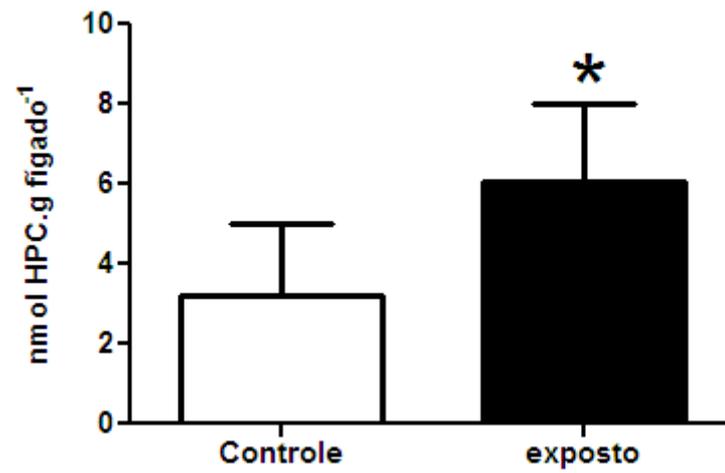


(*) indica diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$.
Fonte: A própria autora.

5.2.7 Peroxidação lipídica

Foi observado aumento de 39% nos índices de peroxidação lipídica hepática de pacus expostos à deltametrina por 96 h (Figura 12).

Figura 12 - Concentração de hidroperóxido de cumeno (HPC) em fígado de pacus expostos à deltametrina por 96 h.



(*) indica diferença significativa entre os grupos para $p < 0,05$.

Fonte: A própria autora.

6 DISCUSSÃO

6.1 Estimativa da toxicidade aguda $CL_{(t)50;48h}$ de deltametrina (Keshet[®]) para juvenis de pacu

Diversos estudos demonstram a elevada toxicidade dos piretroides sobre organismos não alvos, tais como insetos polinizadores (BADIOU; BELZUNCES, 2008), répteis (ALEXANDER; HORNE; HANRAHAN, 2002) e peixes (HAYA, 1989). Diferenças quanto à sensibilidade entre as classes de vertebrados parecem estar relacionadas a variações no metabolismo de drogas (GLICKMAN; LECH, 1981; EDWARDS; MILLBURN; HUTSON, 1986). Mesmo dentro de uma mesma classe de vertebrados há variações quanto à toxicidade da deltametrina. Em peixes são relatados, entre outros, os seguintes valores de CL_{50} : 0,21 $\mu\text{g L}^{-1}$ para embriões de carpa comum, após 48 h (KÖPRÜCÜ; AYDIN, 2004); 2,57 $\mu\text{g L}^{-1}$ para “killifish”, *Aphanius dispar*, após 96 h (AL-GHANBOUSI; BA-OMAR; VICTOR, 2012); 5,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ para lebiste, *P. reticulata*, após 48 h (VIRAN *et al.*, 2003); 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ para tilápia do Nilo, após 48 h (GOLLOW; GODZI, 1994); chegando a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para truta arco-íris, após 96 h (VELISEK *et al.*, 2007). Apesar de variados, todos esses valores encontram-se na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, revelando sua elevada toxicidade.

Não há estudos sobre a toxicidade aguda de piretroides para pacu. Quanto à deltametrina, essa espécie mostrou-se menos sensível que o matrinxã, *Brycon amazonicus* (CORTELLA, 2010). No entanto, quando comparada a outros xenobióticos, as respostas são variáveis: o pacu mostra-se mais sensível ao triclorfon, um inseticida organofosforado, do que outras espécies tropicais, tais como tilápia e carpa (VENTURINI, 2010); todavia, mostra-se pouco sensível ao fenol, apresentado uma $CL_{50;96h}$ de 33 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (FIGUEIREDO, 2008).

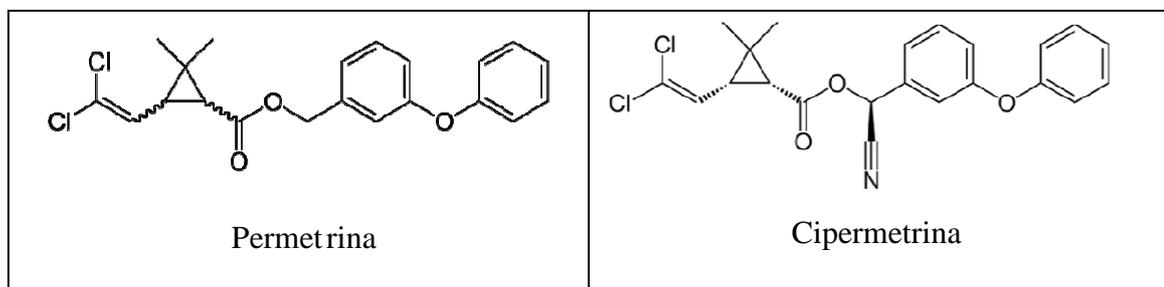
Essas diferenças de toxicidade aos xenobióticos podem estar relacionadas à percepção da espécie a esses compostos. Pesticidas em geral são pouco percebidos pelo sistema olfatório de peixes, o que pode levá-los a não evitar ambientes contaminados. Por outro lado, hidrocarbonetos podem ser percebidos, levando a um comportamento de evitação (TIERNEY *et al.*, 2010). Outro fator possivelmente envolvido com a toxicidade é a propriedade dos compostos tóxicos de ultrapassar a barreira de muco, externa ou branquial, a qual pode ser aumentada em determinadas circunstâncias (SHEPHARD, 1994). Durante a exposição aguda à deltametrina, observamos grande quantidade de muco nas superfícies corporal e branquial dos indivíduos mortos. Não só a exposição a xenobióticos é capaz de gerar grande quantidade de muco, mas também a agressão causada por microrganismos. Assim, pacus infectados por

Aeromonas hydrophila, apresentam maior produção de muco, o que parece ser uma resposta adaptativa à presença do estressor (CARRASCHI *et al.*, 2012).

As alterações comportamentais observadas no presente estudo são semelhantes às aquelas relatadas para tilápia do Nilo, lebiste, truta arco-íris e carpa comum expostos à deltametrina (YILDIRIM *et al.*, 2006; EL-SAYED; SAAD; EL-BAHR, 2007; VIRAN *et al.*, 2003; VELISEK; STARA; SVOBODOVA, 2011) e para carpa, *Labeo rohita*, e jundiá expostos à cipermetrina (MARIGOUDAR; AHMED; DAVID, 2009; BORGES *et al.*, 2007) e ocorrem poucas horas após a aplicação do tóxico. Essas respostas podem estar diretamente relacionadas à ação neurotóxica dos piretroides do tipo II sobre os canais de Na⁺ de neurônios e à inibição de canais de cloreto; ou ainda, à inibição da enzima acetilcolinesterase, levando ao acúmulo de neurotransmissores na fenda sináptica, tal como sugerido por Dziaman e colaboradores (2000), que atribuem à inibição da condução sináptica a deficiência observada no aprendizado de carpas expostas à deltametrina.

Não existe no Brasil regulamentação acerca da concentração permitida de piretroides do tipo II na água. Há apenas portarias do Ministério da Saúde, sendo a mais recente a Portaria Nº 2.914/2011 (BRASIL, 2011), que limitam a concentração máxima de permetrina, um piretroide do tipo I, em 20 µg·L⁻¹ em águas destinadas ao consumo humano. No entanto, a toxicidade de compostos do tipo I é muito menor do que a de compostos do tipo II. Por exemplo, permetrina e cipermetrina são compostos que diferem apenas quanto à presença do grupo α-ciano na cipermetrina (Figura 17). A CL50;24h para *Drosophila melanogaster* é de 580 µg·mL⁻¹ para permetrina e de 2,16 µg·mL⁻¹ para cipermetrina; uma diferença de 268 vezes.

Figura 13 - Comparação entre as fórmulas estruturais do piretroide tipo I, permetrina, e do piretroide tipo II, cipermetrina.



Fonte: US-Environmental Protection Agency.

Apesar de serem considerados pouco tóxicos para mamíferos, não são conhecidos os efeitos da exposição de longa duração aos piretroides. Imamura e colaboradores (2006) mostraram aumento na expressão de fatores envolvidos na modulação de transmissões sinápticas em neurônios de ratos tratados com deltametrina, levando a danos na função cerebral. Dessa forma, aceitando-se o padrão brasileiro estabelecido, consideram-se potáveis os corpos de água com concentrações de piretroides letais para várias espécies de animais. Além disso, apesar de úteis para estabelecer limites para a proteção da biota aquática, os testes de mortalidade aguda ignoram a “morte ecológica” das espécies, que geralmente ocorre em concentrações muito abaixo daquelas que causam mortalidade significativa (SCOTT; SLOMAN, 2004). Seria desejável, portanto, que a legislação contemplasse limites específicos para os tipos mais utilizados de inseticidas piretroides - assim como ocorre nas agências de proteção ambiental norte-americana e européia - visando uma aplicação racional e sustentável, que ponderasse, além da segurança humana, os riscos ambientais.

6.2 Exposição subletal a 10% da CL(I)50;48h de deltametrina (Keshet[®])

6.2.1 Variáveis hematológicas

Os elementos sanguíneos são considerados biomarcadores promissores de intoxicação por pesticidas, uma vez que amostras de sangue podem ser obtidas de animais teste de forma não letal (SINGH; SRIVASTAVA, 2010), e as alterações hematológicas, apesar de não serem específicas ao estressor químico, podem dar informações a respeito da fisiologia geral e do estado de saúde do organismo sob investigação (van der OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Diversas alterações hematológicas são descritas em peixes expostos a concentrações subletais de piretroides. Há relatos de alterações morfológicas dos elementos sanguíneos, tais como eritrócitos crenados, diminuições no número de eritrócitos, do valor de hematócrito e de hemoglobina total, geralmente associadas a anemias, além de leucopenia e aumento do tempo de coagulação (SINGH; SRIVASTAVA, 2010).

No presente trabalho, algumas alterações hemáticas dos pacus expostos à concentração subletal de deltametrina ($1,73 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ por 96 horas) indicam discreto comprometimento da saúde destes indivíduos. Reduções nos valores de RBCC e hematócrito indicam que o número de eritrócitos diminuiu, refletindo assim um quadro de eritropenia. No entanto, o tamanho das hemácias restantes se manteve, já que o VCM não se alterou.

A eritropenia pode ter duas causas: ação deletéria do inseticida sobre a produção de novas hemácias ou aumento na sua taxa de destruição (hemólise). Adedeji e colaboradores (2009) postulam que a diminuição observada no RBCC de bagre africano, *C. gariepinus*, exposto ao inseticida OP diazinon, pode ser devida a um efeito supressor do tóxico nos tecidos eritropoiéticos, resultando em diminuição na produção de hemácias. Avaliações histológicas em rim de *C. carpio* exposta à deltametrina mostram a ocorrência de núcleos picnóticos no tecido hematopoiético, indicando a possibilidade de efeitos danosos desse tóxico sobre a produção de hemácias (CENGIZ, 2006). Por outro lado, a hipótese de hemólise é corroborada no presente trabalho pela sugestão de estresse oxidativo causado pela exposição à deltametrina. Por serem ricas em ácidos graxos poliinsaturados, as membranas biológicas de peixes são particularmente sensíveis à ação de ERO, o que pode levar ao acúmulo de hidroperóxidos, à diminuição da fluidez das membranas e, por fim, ao seu rompimento (NAGASAKA; OKAMOTO; USHIO, 2004). Segundo Lushchak (2011), a sensibilidade dos eritrócitos ao estresse oxidativo é confirmada pela hemólise e formação de metahemoglobina observadas em hemácias de truta arco-íris expostas ao ozônio. Segundo o autor, o ozônio não atacou as pelo lado de fora, mas sim, atravessou a membrana e estimulou a produção de ERO pela hemoglobina intracelular.

A ocorrência de eritropenia também é relatada em alevinos de carpa indiana, *C. catla*, expostos a 1/3 da CL50 de deltametrina (VANI *et al.*, 2011). Porém, além da diminuição dos valores de RBCC e Ht, essa espécie apresenta redução na concentração de hemoglobina total, associada com a ocorrência de hemólise. Entretanto, em pacu exposto à deltametrina, a resposta foi oposta. O aumento observado nos valores de HCM indica que as células remanescentes na circulação contêm maior quantidade de hemoglobina. Não há, portanto, prevailecimento de um quadro anêmico e o conseqüente comprometimento da oxigenação. Os dados de metabolismo também sugerem uma condição estável de transporte de oxigênio, visto que os níveis de ácido láctico não se alteraram.

Exposições às classes mais relevantes de inseticidas (OP, carbamatos e piretroides) comumente levam ao desenvolvimento de anemia em peixes (SINGH; SRIVASTAVA, 2010, VANI *et al.*, 2012). A carpa *Labeo rohita* exposta a concentração subletal de cipermetrina por 28 dias exhibe anemia macrocítica (ADHIKARI *et al.*, 2004). Em mamíferos, quadros anêmicos são descritos em cabras (KHAN *et al.*, 2008) e camundongos, principalmente fêmeas, tratados com deltametrina (SAOUDI *et al.*, 2011; HARATYM-MAJ, 2002). Há ainda, casos contrários, com aumento de eritropoiese. Truta arco-íris (VELISEK *et al.*, 2007), tilápia do Nilo (EL-SAYED; SAAD; EL-BAHR, 2007), cascudo *Ancistrus multispinis*

(PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2007) e bagre *Heteropneustis fossilis* (KUMAR; LATA; GOPAL, 1999) expostos à deltametrina ou cipermetrina apresentam aumento do número de células vermelhas, da concentração de hemoglobina total e do hematócrito. Essa produção de células novas é justificada como um mecanismo de defesa contra a hipóxia no sistema nervoso central (PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2007). No presente trabalho, o transporte de oxigênio é garantido pelo aumento adaptativo de hemoglobina nas hemácias restantes.

Comparando-se as alterações hematológicas observadas em pacu exposto à deltametrina ou ao inseticida OP triclorfon – que causa apenas discreta redução da concentração de Hb total (VENTURINI, 2010) – àquelas observadas em outras espécies expostas aos mesmos xenobióticos, pode-se dizer que o pacu tem mecanismos adaptativos capazes de minimizar os efeitos da exposição. Paralelamente às alterações na série vermelha, o pacu exposto ao Keshet[®] apresentou alterações plasmáticas.

O aumento na concentração de íons sódio e cloreto, além das proteínas totais plasmáticas, sugerem perda de água, ou um quadro de desidratação. Esse quadro também é observado em gafanhoto, *Locusta migratoria*, tratado com deltametrina (PROUX *et al.*, 1993). O aumento da diurese é o primeiro indicador de desequilíbrio da homeostase, subsequente ao efeito neurotóxico, e que pode ser o efeito fisiológico inicial a contribuir para a morte do inseto. Algumas alterações na regulação iônica de peixes, desencadeadas pela exposição a contaminantes, são relatadas na literatura. Não há, no entanto, sugestões diretas de desidratação. Hori e colaboradores (2006), avaliando os efeitos da exposição subletal de matrinxã ao fenol, observaram aumento na concentração de proteína plasmática, porém acompanhada de redução na concentração do íon cloreto. Esses autores atribuem a redução do cloreto a uma adaptação fisiológica para manter o balanço iônico, já que as proteínas também apresentam carga global negativa no pH sanguíneo. Entretanto, o pacu não apresentou tal compensação, reforçando a hipótese de desequilíbrio iônico.

Jundiá, *Rhamdia quelen*, exposto a doses subletais de cipermetrina, apresenta aumento nas concentrações plasmáticas de sódio, potássio, magnésio e fósforo, porém com diminuição de proteínas totais (BORGES *et al.*, 2007). Alevinos de carpa *C. carpio*, expostos por sete dias a 10% da CL50 de cipermetrina, apresentam aumento de sódio e potássio plasmáticos e redução de cloreto; porém, após exposição aguda ao inseticida ou a períodos prolongados de exposição subletal, a concentração desses íons diminui (SUVETHA; RAMESH; SARAVANAN, 2010). A concentração de íons também diminui em cérebro, brânquias, rim, músculo e intestino de bagre *Clarias batrachus* exposto a 1/3 da CL50 de deltametrina

(KUMAR 2012). Essa perda é associada a danos renais ou branquiais. Essas alterações iônicas observadas em peixes são atribuídas por vários autores à inibição da Na^+/K^+ -ATPase.

Nós correlacionamos as alterações iônicas observadas em pacu exposto ao Keshet® à inibição da enzima Na^+/K^+ -ATPase. As adenosina-trifosfatases (ATPases) são um grupo de enzimas de membrana presentes em todos os tipos celulares e responsáveis pelo transporte de íons, com gasto de ATP. A Na^+/K^+ -ATPase é um trocador iônico da membrana celular, cuja alteração pode estar envolvida na neurotoxicidade de piretroides (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989). Nas brânquias, essa enzima está presente na membrana basolateral do epitélio branquial e envolvida no transporte de eletrólitos (PARVEZ; SAYEED; RAISUDDIN, 2006). Contaminantes presentes na água entram em contato com a superfície branquial e podem perturbar o balanço iônico e o equilíbrio osmótico, principalmente por inativação de ATPases das células epiteliais; por essa razão, a atividade dessas enzimas tem sido utilizada como biomarcador de ambientes poluídos (VANI *et al.*, 2012).

Inibições da atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial por ação de pesticidas foram observadas por diversos autores. Trutas *Salmo gairdneri* expostas a concentrações subletais de DDT (LEADEM; CAMPBELL; JOHNSON, 1974); *C. carpio* (SUVETHA; RAMESH; SARAVANAN, 2010), *C. mrigala* (PRASHANTH; DAVID, 2010) e *C. catla* (VANI *et al.*, 2012) expostos a cipermetrina; e cascudo *A. multispinis* (SILVA DE ASSIS *et al.*, 2009), *C. batrachus* (KUMAR, 2012) e *C. catla* (VANI *et al.*, 2011) expostos a deltametrina apresentam inibição de Na^+/K^+ -ATPase branquial. Esses autores sustentam que essa inibição se deve a alterações conformacionais da enzima, bloqueio de rotas metabólicas da produção de ATP, ou ainda, rompimento das membranas celulares, causado por entrada descontrolada de sódio e, acompanhando o gradiente osmótico, de água, levando ao intumescimento e posterior rompimento celular. Evidências histológicas mostram a ocorrência de edemas e de necrose nas brânquias de *Gambia affinis* exposto à deltametrina (CENGIZ; UNLU, 2006). Ensaio *in vitro* da atividade da Na^+/K^+ -ATPase branquial de pacu na presença de deltametrina podem dar indícios sobre o efeito deste tóxico na estrutura tridimensional da enzima.

6.2.2 Metabolismo intermediário

A exposição de peixes a xenobióticos é capaz de causar alterações no metabolismo intermediário com reflexos no organismo como um todo, tais como taxa metabólica e

desempenho natatório, ou com respostas teciduais, tais como disponibilidade de substratos metabólicos e atividades enzimáticas (SCOTT; SLOMAN, 2004). Os efeitos adversos de concentrações subletais de contaminantes incluem, mais do que a estimativa de mortalidade, alterações em certos processos biológicos vitais. A observação dessas alterações pode levar ao desenvolvimento de biomarcadores de efeito da exposição a pesticidas (SEPICI-DINÇEL *et al.*, 2009).

As alterações observadas no metabolismo intermediário de pacu após exposição subletal à deltametrina indicam alteração do balanço energético do animal, podendo interferir não apenas em sua sobrevivência, mas também nas funções ecológicas da espécie, tais como forrageamento, fuga de predadores e reprodução. No fígado dos animais expostos, o aumento do teor de proteínas hepáticas pode estar associado à desidratação plasmática, já discutida anteriormente. Esse quadro de desidratação pode ter reduzido a volemia com reflexo na hidratação tissular.

O fígado é um órgão vital com elevado metabolismo glicídico e seriamente afetado por xenobióticos. Nos peixes, esse é considerado o primeiro órgão de desintoxicação e todos os tóxicos passam por ele para metabolização e excreção. A concentração de xenobióticos, a conversão metabólica que ocorre nos hepatócitos e a excreção de compostos tóxicos ou de seus metabólitos na bile, contribuem para sua vulnerabilidade frente à intoxicação (BEGUM; VIJAYARAGHAVAN, 1995). As enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos são frequentemente alteradas pela exposição a poluentes. Em muitos casos, o catabolismo glicídico aeróbico aumenta, possivelmente para compensar o custo extra das reações de desintoxicação (SCOTT; SLOMAN, 2004). Kumaraguru e Beamish (1983) sugerem que truta exposta à permetrina tenha um aumento da taxa metabólica basal devido a um aumento na demanda energética por estresse fisiológico, processos de desintoxicação e reparo tecidual. O aumento da taxa metabólica observado em pacu pode ter levado a um aumento concomitante no consumo de oxigênio, assim como descrito para a carpa *L. rohita* exposta à cipermetrina (MARIGOUDAR; AHMED; DAVID, 2009). Logo, nossa hipótese de que não houve comprometimento do transporte de oxigênio é corroborada pela manutenção nos teores de lactato nos tecidos e no plasma, indicando que não houve demanda do processo fermentativo. É preciso verificar em estudos posteriores, no entanto, a possibilidade de ocorrência, no pacu, da via fermentativa alcoólica, assim como ocorre em *Carassius auratus* submetido à anóxia (SHOUBRIDGE; HOCHACHKA, 1980). Nesse caso, não poderíamos supor a manutenção do metabolismo oxidativo pela não alteração de lactato.

Também há indícios do consumo de reservas do tecido hepático. Glicogênio, glicose e ácidos graxos livres foram degradados como fonte de energia para o tecido. O glicogênio deve ter participado da manutenção da glicemia. Glicogenólise hepática foi observada também em juvenis de salmão do Atlântico mantidos sem alimentação e expostos ao piretroide fenvalerato por 70 horas (HAYA, 1989). Esse autor considera que há um efeito aditivo do jejum e da intoxicação, pois foi maior a diminuição da reserva de glicogênio nos peixes mantidos concomitantemente nas duas condições. Observação semelhante é descrita para o bagre *H. fossilis* exposto à cipermetrina (SAHA; KAVIRAJ, 2008). Segundo esses autores, a diminuição nas reservas de glicogênio atua como um passo regulatório contra a ameaça de um xenobiótico. Ela aumenta o metabolismo intermediário, resultando em proteção dos hepatócitos. Begum e Vijayaraghavan (1995) relacionam a depleção nas reservas de glicogênio hepático de bagres *C. batrachus*, expostos ao inseticida OP dimetoato, ao *up regulation* das enzimas da glicogenólise ou ao *down regulation* das enzimas envolvidas com a síntese de glicogênio. Isso ocorreria por que o pesticida estimularia as células α do pâncreas, aumentando os níveis de AMP_{3,5} celular, convertendo a fosforilase b em a e aumentando a glicogenólise. As atividades inalteradas das enzimas ensaiadas nesse tecido indicam que o metabolismo hepático esteve direcionado à manutenção da glicemia e à exportação de glicose para outros tecidos, e que a reserva energética foi suficiente.

A hiperglicemia observada no pacu deve-se, provavelmente, à exportação de glicose do tecido hepático. A hiperglicemia é tradicionalmente referida como um indicador de estresse, em resposta à liberação de catecolaminas. Aguiar e colaboradores (2004) descrevem fenômeno semelhante ao observado neste trabalho em matrinxãs expostos ao inseticida organofosforado metil- paration. El-Sayed e Saad (2007) correlacionaram a hiperglicemia observada em tilápia nilótica exposta a inseticidas à base de deltametrina, ao aumento na síntese dos hormônios adrenocorticotrópico e glucagon e à diminuição na síntese de insulina. Dessa forma, o glicogênio hepático seria rapidamente convertido em glicose e passaria para a circulação sistêmica, aumentando a concentração de glicose sanguínea. Contrariamente, Eraslan *et al.* (2007) avaliando as respostas de camundongos, e Velisek *et al.* (2007), avaliando as respostas de truta arco-íris tratados com deltametrina, encontraram quadros de hipoglicemia. As justificativas encontradas por esses autores são a diminuição na síntese dos hormônios citados ou o aumento da demanda energética, a ponto de esgotar a glicose produzida. Sepici-Dinçel e colaboradores (2009) admitem que o aumento na glicemia é uma resposta secundária geral de peixes ao estresse causado por tóxicos, sendo considerado um

indicador confiável de estresse ambiental. Uma das respostas primárias ao estresse seria o aumento na cortisolemia, fator esse não avaliado no presente trabalho.

No músculo branco de pacu, observamos proteólise, inferida pela redução na concentração de proteína. A concentração inalterada de aminoácidos livres deve-se ao fato de serem imediatamente transaminados, com produção de piruvato, oxalacetato e glutamato. Daí o teor elevado de piruvato nesse tecido. Este intermediário deve estar sendo utilizado para gerar acetil-CoA e alimentar o Ciclo de Krebs, uma vez que o teor de lactato não se altera. O glutamato gerado pelas reações catalisadas pela ALAT e pela ASAT estaria sendo desaminado pela GDH. A manutenção nos teores de amônia nos três compartimentos estudados indica que não houve prejuízos à excreção nitrogenada de pacus expostos ao Keshet[®]. Velisek e colaboradores (2006; 2007) descrevem aumento nos teores plasmáticos de amônia em truta arco-íris e carpa expostas à deltametrina e associam tal fenômeno à inabilidade do organismo em converter a amônia, proveniente do catabolismo de aminoácidos, em uma substância menos prejudicial.

A glicose parece ter sido o combustível inicial no metabolismo muscular dos peixes intoxicados, sendo posteriormente substituída por proteína. A *down regulation* da enzima PK reforça essa hipótese: a desfosforilação de fosfoenolpiruvato está diminuída. Isso nos faz supor que a PK muscular de pacu seja regulada negativamente por alanina, assim como ocorre com a PK hepática.

Pacus expostos à deltametrina apresentam algumas alterações no metabolismo muscular semelhante às aquelas observadas em matrinxãs expostos ao fenol. Hori e colaboradores (2006) observaram aumentos na atividade de ALAT e ASAT, na concentração de piruvato e reduções na atividade da PK e da concentração de glicose muscular. No entanto, esses autores observaram também mudanças no perfil de lactato, sugerindo gliconeogênese. Diferentemente do observado em matrinxã, em pacu há uma preferência por proteínas em lugar de carboidratos como substrato energético muscular. Outra possível explicação para as alterações observadas no metabolismo de pacu exposto ao inseticida à base de deltametrina é a ação do cortisol.

A ação agressiva de um pesticida é usualmente responsável pela indução de estresse. O estresse é uma resposta a qualquer situação que ameace a homeostase e resulta na ativação do eixo hipotálamo-pituitária-tecido inter-renal (HPI) e do sistema nervoso autônomo simpático. A ativação do eixo HPI leva à secreção de glicocorticoides pelo tecido inter-renal. O cortisol, principal corticosteroide em peixes, aumenta a glicemia por indução da gliconeogênese através de duas ações: estímulo da proteólise e consequente liberação de

aminoácidos de tecidos periféricos, principalmente de músculo, e indução da síntese de enzimas-chave da gliconeogênese (RAHIMI; ABDOLLAHI, 2011). O aumento da concentração de glicose resultante de estresse fornece substrato aos tecidos periféricos para atender a demanda energética aumentada (SARMA *et al.*, 2010). A quantificação e qualificação de aminoácidos e de cortisol plasmáticos, além da avaliação da atividade de enzimas neoglicogênicas hepáticas em animais expostos, fazem-se necessárias para inferências mais precisas sobre a ação do piretroide no metabolismo energético.

Finalmente, é interessante a comparação entre as alterações do metabolismo intermediário observadas neste trabalho com aquelas observadas por Venturini (2009) em pacus expostos ao inseticida OP triclorfon. Os intermediários que apresentaram variação em resposta à deltametrina apresentam um perfil oposto quando o agente tóxico é o OP. Enquanto nós constatamos glicogenólise hepática e hiperglicemia, em pacu exposto a OP observa-se neoglicogênese e hipoglicemia; na musculatura, a resposta de pacu exposto ao piretroide foi proteólise, enquanto que ao OP observou-se catabolismo de ácidos graxos. Portanto, este conjunto de observações discutido acima indica que as alterações metabólicas provocadas por inseticidas são específicas para a classe do composto e variam mesmo dentro das espécies, o que exige maior rigor no estabelecimento dos biomarcadores de exposição a piretroides.

6.2.3 Metabolismo antioxidante

Desde a Revolução Industrial, o ambiente e os organismos aquáticos vêm sendo particularmente ameaçados, devido à crescente quantidade de poluentes despejados nos corpos d'água. Muitos desses compostos e/ou seus metabólitos podem apresentar efeitos tóxicos além de causar estresse oxidativo. O metabolismo celular básico de organismos aeróbicos envolve a produção de radicais livres de oxigênio e de espécies reativas não radicais (como H₂O₂), fisiologicamente importantes, por exemplo, na sinalização celular e inflamação. No entanto, alguns compostos têm a capacidade de aumentar a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, podendo levar ao estresse oxidativo (BAINY *et al.*, 1996; van der OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Os compostos tóxicos que entram em um organismo exposto passam pelo processo de biotransformação, principalmente no fígado, que consiste de algumas reações enzimáticas e modifica o xenobiótico tornando-o mais solúvel e facilmente eliminado. Esse processo é dividido em duas fases: na fase I participa o sistema de mono-oxigenases dependentes de

citocromo P450; na fase II, uma série de transferases, que catalisam reações de conjugação (ORELLANA; GUAJARDO, 2004).

A mono-oxigenação catalisada pela família dos citocromos P450 é a principal reação da fase I do metabolismo de xenobióticos, e requer, necessariamente, a coenzima NADPH+H⁺ e oxigênio molecular, além do complexo multienzimático. As enzimas desse complexo são hemoproteínas de membrana, particularmente abundantes no retículo endoplasmático liso. Esse sistema realiza oxidação, na qual um dos átomos do oxigênio molecular é reduzido à água, e o outro é incorporado ao substrato, tornando-o mais reativo e hidrossolúvel. No entanto, durante o ciclo redox que envolve as hemoproteínas e transferências de elétrons, pode haver geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente do ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) além do próprio radical substrato (ORELLANA; GUAJARDO, 2004; AVILEZ, 2008).

As reações da fase II da biotransformação podem ocorrer na molécula original do xenobiótico ou após sua passagem pelas reações da fase I. Diferentes enzimas catalisam a conjugação do xenobiótico com moléculas de natureza endógena, tais como ácido glicurônico, sulfatos, acetato, o tripeptídeo glutationa e alguns aminoácidos (ORELLANA; GUAJARDO, 2004).

Entre os diversos biomarcadores ecotoxicológicos propostos nas últimas décadas estão aqueles baseados no balanço entre pró e antioxidantes. Além disso, as consequências de um desbalanceamento entre ambos, tais como danos ao DNA, peroxidação lipídica e inibição enzimática, também representam sinais precoces de distúrbios ambientais (AMEUR *et al.*, 2012). A avaliação do balanço oxidativo do pacu exposto ao Keshet[®] mostra uma relativa deficiência nos elementos antioxidantes, já que observamos injúrias celulares resultantes de peroxidação lipídica. A oxidação de lipídios é o indicador mais utilizado nas pesquisas envolvendo radicais livres porque muitos organismos, especialmente os aquáticos, contêm grande quantidade de lipídios com resíduos de ácidos graxos poli-insaturados, passíveis de oxidação devido às duplas ligações. O radical hidroxil (\cdot OH), gerado nas reações das mono-oxigenases ou, espontaneamente, a partir de H₂O₂ na presença de Fe²⁺, é um potente iniciador da peroxidação lipídica (LUSHCHAK, 2011; REGOLI *et al.*, 2011).

Para Sayeed e colaboradores (2003), o aumento na peroxidação lipídica observado em fígado, brânquias e rim de *C. punctatus* exposto à deltametrina por 48 horas é devido à produção de radicais livres e à ocorrência de estresse oxidativo. Esses autores defendem que as espécies reativas são produzidas devido à deficiência dos peixes em metabolizar e eliminar inseticidas piretroides. A peroxidação de lipídios integra o efeito nocivo causado pelas

espécies oxiradicaís que não podem ser contrabalanceadas pelas defesas antioxidantes naturais com a consequente desestabilização de membranas e de enzimas associadas (SOLÉ *et al.*, 2008). Sepici-Dinçel e colaboradores (2009) indicam a peroxidação lipídica induzida por estresse oxidativo como um mecanismo adicional da toxicidade do piretroide ciflutrina em alevinos de *C. carpio*, além da neurotoxicidade.

Tendo em vista o aumento da peroxidação lipídica nos hepatócitos de pacu e, portanto, o suposto excesso de oxiradicaís, esperávamos observar atividades aumentadas de SOD e de CAT, enzimas cuja ação em sequência evita a formação do radical hidroxila. Valores inalterados da atividade dessas enzimas poderiam sugerir que a deltametrina não causou estresse oxidativo no fígado de pacu exposto à deltametrina. Esses resultados são muito semelhantes aos encontrados por Avilez *et al.* (2008), em que matrinxãs expostos à concentração subletal de fenol também não apresentaram mudanças nos elementos antioxidantes hepáticos após 96 horas de exposição. Entretanto, após períodos de recuperação em água livre de xenobiótico, algumas enzimas tiveram a atividade aumentada. Esses autores também esperavam o aumento na atividade de SOD e CAT, e sugerem que a não alteração deve-se ao fato do fenol não agir como oxidante direto ou como produtor de radicais livres. A metabolização do tóxico pelo sistema de mono-oxigenases microssomais ocorreria somente no período de recuperação. Entretanto, há indícios de que a metabolização da deltametrina pelo sistema do citocromo P450 ocorra logo após a exposição, diferentemente do fenol. Silva de Assis e colaboradores (2009), avaliando as respostas de *A. multispinis* exposto à deltametrina, observaram aumento nos níveis hepáticos de citocromo P450 total, bem como na atividade de EROD (enzima utilizada para medir indiretamente a atividade de citocromo P450), sugerindo que as reações de biotransformação da fase I ocorrem dentro de 96 horas. A superexpressão de genes da família de citocromo P450 está relacionada à resistência do mosquito *Anopheles gambiae* ao tratamento com inseticidas à base de permetrina e cipermetrina (STEVENSON *et al.*, 2011). A mesma indução é descrita por Regoli e colaboradores (2011) em enguias expostas a sedimentos alta e moderadamente contaminados; esses autores observaram ainda que a produção de RNA mensageiro do citocromo e a atividade catalítica de EROD são dose-dependentes em fígado e brânquias.

As principais reações atribuídas ao metabolismo de piretroides são oxidações mediadas pelo sistema de mono-oxigenases microssomais. As vias de degradação em bovinos, aves domésticas e peixes são semelhantes às descritas para roedores, porém, estudos comparativos *in vivo* e *in vitro* mostraram que os peixes têm a menor capacidade para metabolizar e eliminar inseticidas piretroides (PIMPÃO; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS,

2007). Pertencendo à classe química dos ésteres, os piretroides seguem vias metabólicas que incluem hidrólise da ligação éster central e oxidação das porções ácido a álcool. A taxa dessas transformações e a natureza dos metabólitos dependem principalmente do organismo envolvido. Em aves e mamíferos, os piretroides são rapidamente metabolizados e excretados, enquanto em peixes, o sistema enzimático envolvido na hidrólise é reduzido, culminando em elevada toxicidade. Anfíbios apresentam sensibilidade intermediária aos piretroides, sendo pouco mais resistentes que peixes (EDWARDS; MILLBURN; HUTSON, 1986; DEMOUTE, 1989; DINU *et al.*, 2010).

Após passagem pelo sistema das mono-oxigenases, os piretroides são transformados em metabólitos hidroxilados, preferencialmente na posição 4'. Em ratos, estudos cromatográficos identificaram a 4'-OH-deltametrina (ANAND *et al.*, 2006), e esse deve ser também o produto da mono-oxigenação em peixes, já que 4'-OH-permetrina e 4'-OH-cipermetrina foram os principais metabólitos de fase I de truta arco-íris e de peixe-rei, *Odontesthes bonariensis*, respectivamente. Esse subproduto tem sido relacionado à neurotoxicidade dos piretroides, uma vez que foi encontrado em quantidades consideráveis no cérebro de truta arco-íris (GLICKMAN *et al.*, 1981; EDWARDS; MILLBURN; HUTSON, 1986; CARRIQUIRIBORDE *et al.*, 2012).

Enquanto em aves e mamíferos os passos seguintes da biotransformação de piretroides são clivagem da ligação éster e oxidação, primeiramente na posição 4', em peixes a rota principal é a conjugação com ácido glicurônico e/ou sulfato devido à baixa atividade de esterases, seguida da eliminação pela bile (CARRIQUIRIBORDE *et al.*, 2012). Alguns autores reforçam o aumento nos processos de conjugação de piretroides. Sayeed *et al.* (2003), Cortella (2010) e Dinu *et al.* (2010) observaram aumentos na atividade de glutathione-S-transferase (GST) em fígado de *C. punctatus*, de matrinxã e de *Carassius auratus gibelio*, respectivamente, expostos à deltametrina. Em *C. auratus*, esses autores constataram que a atividade dessa enzima é maior nos dois primeiros dias após a adição do tóxico, retornando aos valores semelhantes ao controle após sete e 14 dias. Portanto, admitimos que no início da exposição do pacu ao inseticida, a SOD não tenha sido suficiente para debelar o estresse oxidativo devido à grande produção de ERO pelos processos de biotransformação. A atividade de CAT, por sua vez, pode ter sido inibida pelo excesso de ânions superóxido, como relatado em outros experimentos (SAYEED *et al.*, 2003; CORTELLA, 2010). Após os primeiros dias de exposição, não sendo o tóxico readicionado aos tanques sua concentração deve ter se estabilizado ou, até mesmo, diminuído, de modo que os níveis de defesa antioxidante fossem suficientes.

Bainy e colaboradores (1996) observaram aumento de 240% na atividade da SOD hepática de tilápias amostradas da represa Billings, em São Paulo, quando comparadas a tilápias amostradas de locais não contaminados. Esse aumento, porém, foi considerado insuficiente para proteger as células do dano oxidativo, uma vez que a atividade de CAT e de outras enzimas antioxidantes apresentaram-se diminuídas. Inversamente, alguns autores encontraram atividade de SOD diminuída em resposta à exposição a deltametrina, assumindo uma inibição mútua: o excesso de ânions superóxido inibiria a CAT, e o excesso de peróxido, por sua vez, inibiria a SOD (DINU *et al.*, 2010). Ansari e colaboradores (2008) relacionam a inibição de SOD ao aumento na peroxidação lipídica, anormalidades nucleares e formação de micronúcleo nos eritrócitos do bagre *C. punctatus* exposto à deltametrina.

Catalase e GPx são enzimas que trabalham em conjunto para eliminar o excesso de peróxido de hidrogênio, porém a última parece ter contribuição maior contra a toxicidade do peróxido (DINU *et al.*, 2010). Pacu e tambaqui (*Colossoma macropomum*) apresentam, naturalmente, as maiores atividades de GPx já encontradas entre teleósteos e ratos. Essa é, provavelmente, uma adaptação evolutiva ao estresse oxidativo, uma vez que essas espécies podem estar sujeitas, em seu habitat natural, os rios do Pantanal, a ciclos de hipóxia e súbita reoxigenação. A GPx hepática de pacu também apresenta maior afinidade por peróxido de hidrogênio quando comparada à CAT; isso pode justificar a não alteração na atividade de CAT de pacu em nosso trabalho, caso não ocorra inibição por superóxido: essa enzima só seria requisitada em concentrações muito altas de peróxido (DANTAS, 2010).

A redução observada na atividade de GPx após 96 horas de exposição provavelmente tenha sido devida à diminuição na concentração do cosubstrato dessa enzima, GSH. Em relação aos antioxidantes não enzimáticos, a principal defesa celular é a glutatona, encontrada em concentrações muito elevadas no fígado (5-10 mM). A principal função da GSH é a desintoxicação de xenobióticos e/ou seus metabólitos, já que é um dos mais eficientes redutores encontrados nas células. Através de reações catalisadas pela GST, esses compostos são conjugados com GSH e geralmente excretados e eliminados pela bile (SAYEED *et al.*, 2003; LU, 2009). Dessa forma, as moléculas de GSH devem ter sido a primeira defesa antioxidante no início da exposição em face de suposto excesso de peróxido de hidrogênio e de radicais superóxido e hidroxil, esses últimos produzidos espontaneamente pela reação de Haber-Weiss. Essa também é a proposta de Atli e Canli (2007): a GSH é o primeiro antioxidante utilizado por peixes expostos a metais, causando diminuição acentuada em suas reservas. Em pacu, com a reserva de GSH diminuída, a atividade de GPx acaba por ser comprometida. Essa hipótese é corroborada pelo aumento na atividade de G6PDH. Essa

enzima está diretamente relacionada à concentração de NADPH na célula e sua coenzima é essencial à catálise de outra enzima, a glutathione redutase (GR), responsável pela redução da glutathione oxidada e reposição dos estoques de GSH. Quando a oxidação de glutathione excede a capacidade de reconversão da GR, as células tendem a eliminar ativamente o excesso de glutathione oxidada para manter uma porcentagem celular elevada da forma reduzida, funcionalmente ativa; nessas condições, os níveis de glutathione total diminuem, tornando esse parâmetro um biomarcador confiável (REGOLI *et al.*, 2011). A atividade aumentada de G6PDH reflete um maior aporte de NADPH para a atividade da GR. Poucos estudos utilizam a atividade da G6PDH para avaliar a ocorrência de estresse oxidativo. Regoli *et al.* (2011) argumentam que o ensaio bioquímico da atividade dessa enzima tem sensibilidade limitada, e sugerem que a abordagem molecular de quantificação de RNAm em tempo real seja uma alternativa mais fácil e sensível. De qualquer forma, essa enzima é considerada um biomarcador ambiental.

Variações nos níveis de antioxidantes são difíceis de prever e diversos estudos mostraram resultados diferentes para um mesmo parâmetro, tais como indução, inibição, alterações bifásicas ou temporárias de acordo com as condições experimentais, intensidade e duração da exposição, espécie, tecido, estado metabólico ou outros fatores biológicos e ambientais. Tal complexidade pode ser parcialmente explicada considerando-se que o sistema antioxidante é caracterizado por uma ampla gama de antioxidantes de baixo peso molecular e por defesas enzimáticas que interagem numa rede sofisticada. Dessa maneira, não é surpresa que os antioxidantes não variem de maneira sincrônica, mas sim, mostrem diferentes sensibilidades e sequências de ativação, tendo como resultado a indução de alguns parâmetros, a não variação de outros e, ainda, a repressão de alguns. No entanto, valores alterados de antioxidantes sugerem perturbação do estado redox, incluindo aquela induzida por exposição a tóxicos (REGOLI *et al.*, 2002; 2011).

6.3 Neurotoxicidade

O principal papel da acetilcolinesterase (AChE) é a terminação da transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas através de hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina. A utilização da AChE como biomarcador de exposição de peixes a pesticidas é bem estabelecida

O pacu exposto ao Keshet[®] apresentou inibição na atividade cerebral de AChE após 96 horas de exposição, assim como carpa e tenca, que também tiveram a atividade da AChE

inibida por deltametrina após exposições subletais de três e trinta dias, respectivamente (SZEGLLETES *et al.*, 1995; HERNÁNDEZ-MORENO *et al.*, 2010). Outros piretroides também causam efeitos semelhantes: Mushigeri e David (2005) observaram que *Cirrhinus mrigala* exposto ao piretroide fenvalerato, tanto em concentrações letais como em subletais, apresenta inibição da AChE com consequente acúmulo de acetilcolina nos tecidos. Isso é correlacionado com as alterações comportamentais observadas, tais como a inibição do sistema nervoso central e periférico, o que pode levar à morte do organismo. Em ratos, no entanto, a resposta à exposição ao piretroide é diferente. Husain e colaboradores (1996) observaram aumentos significativos na atividade da AChE de várias porções do cérebro após administração oral de deltametrina por 15 dias. Resultado diferente foi observado por Hossain *et al.* (2005) após injeções intraperitoneais subletais do piretroide. Esses autores relacionaram os efeitos agudos no sistema nervoso central não com alterações na AChE, mas sim com modulações da síntese e liberação de acetilcolina. As diferenças observadas nas respostas de peixes e mamíferos podem ser devidas a diferenças nos processos metabólicos e de biotransformação de piretroides entre esses grupos de vertebrados.

Sugerimos que sejam realizados experimentos cinéticos *in vitro* para avaliar o efeito direto da deltametrina sobre a AChE de peixes neotropicais, como o pacu. Bálint e colaboradores (1995) e Badiou e Belzunces (2008), realizaram esses estudos com diferentes espécies, porém os resultados obtidos são conflitantes, e não permitem estabelecer um paralelo com os efeitos observados *in vivo*. A inibição observada nos peixes expostos pode ser devida à ação direta de subprodutos do metabolismo do piretroide sobre a enzima ou à alteração em passos anteriores à expressão da atividade da enzima, tais como repressão de genes, alteração na tradução, ou no enovelamento da proteína.

7 CONCLUSÕES

É comum encontrar trabalhos argumentando que o processo de desintoxicação de xenobióticos leva a uma necessidade energética aumentada. Recentemente, Oliveira e colaboradores (2012) relacionaram o comprometimento da velocidade de natação do camarão comum, *Palaemon serratus*, ao desvio energético para metabolização de deltametrina. No entanto, há sugestões na literatura de que os desbalanceamentos energéticos levem ao estresse oxidativo. Rahimi e Abdollah (2007) discutem que a hiperglicemia, causada por diversos estressores, entre eles inseticidas organofosforados, aumenta a glicação não enzimática, caracterizada pela ligação de glicose ou outros carboidratos aos aminoácidos de proteínas. Essa reação leva à formação de compostos complexos, chamados produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end products*), que alteram a estrutura e a função de proteínas. Proteínas glicadas ativam receptores de membrana específicos e induzem o estresse oxidativo intracelular. Este mesmo mecanismo pode estar envolvido na toxicidade dos piretroides em peixes, tendo em vista as alterações no metabolismo energético e no balanço oxidante observados no presente trabalho.

Análises complementares e mais aprofundadas, avaliando os efeitos hormonais e moleculares da exposição ao piretroide deltametrina podem ajudar a elucidar se há e quais são os fenômenos fisiológicos envolvidos na toxicidade desses compostos, além da modificação do fluxo iônico na transmissão nervosa.

Finalmente, neste trabalho, pudemos tirar as seguintes conclusões imediatas:

- O valor encontrado da toxicidade aguda (CL(D)50;48h) de deltametrina, na formulação comercial Keshet[®], para juvenis de pacu foi de 17,32 $\mu\cdot\text{L}^{-1}$.
- Pacu exposto à concentração subletal de deltametrina apresenta:
 - 1) discreta eritropenia;
 - 2) alterações do balanço iônico;
 - 3) glicogenólise e proteólise para atender as demandas energéticas oriundas da intoxicação;
 - 4) estresse oxidativo
 - 5) inibição *in vivo* da atividade de acetilcolinesterase cerebral.

8 REFERÊNCIAS

- ADEDEJI, O.B.; ADEYEMO, O.K.; AGBEDE, S.A. Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*). **Afr. J. Biotechnol.**, v. 8, n. 16, p. 3940-3946, 2009.
- 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). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 58, p. 220-226, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução Nº 61**. Brasília, 17 mar. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=3027&word=deltamethrin>>. Acesso em: 22 nov. 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR. **Seminário de mercado de agrotóxico e regulação**. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- AGUIAR, L.H. et al. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environ. Res.**, v. 95, p. 224-230, 2004.
- ALEXANDER, G.J.; HORNE, D.; HANRAHAN, S.A. An evaluation of the effects of deltamethrin on two non-target lizard species in the Karoo, South Africa. **J. Arid Environ.**, v. 50, p. 121-133, 2002.
- AL-GHANBOUSI, R.; BA-OMAR, T.; VICTOR, R. Effect of deltamethrin on the gills of *Aphanius dispar*: a microscopic study. **Tissue and Cell.**, v. 44, p. 7-14, 2012.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH AGENCY - APHA. **Standard methods for examination of water and wastes**. 12. ed., Washington, DC: Joint Editorial board, 1980.
- AMEUR, W.B. et al. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mulles (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte lagoon (Tunisia). **Mar. Pollut. Bull.**, v. 64, p. 241-251, 2012.
- ANADÓN, A. et al. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-metabolite in the rat. **Toxicol. App. Pharm.**, v. 141, p.8-16, 1996.
- ANAND, S.S. et al. Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. **Toxicol. App. Pharmacol.**, v. 212, p. 156-166, 2006.
- 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, 2008.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARAÚJO, R.A. et al. Impacto causado por deltametrina em coleópteros de superfície do solo associados à cultura do milho em sistemas de plantio direto e convencional. **Neotrop.Entomol.**, v.33, p.379-385, 2004.

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

ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 25, p. 33-38, 2008.

AVILEZ, I. M. **Estudo do metabolismo antioxidativo, a biotransformação hepática e as alterações histológicas de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), matrinxã, (Teleostei; Characidae), submetido ao fenol.** 2007. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2007.

AVILEZ, I.M. et al. Effects of phenol in antioxidant metabolism in mtarinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 148, p. 136-142, 2008.

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

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

BÁLINT, T. et al. Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla Anguilla* L.) devastations that occurred in Lake Balaton en 1991 and 1995. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, n. 37, p. 17-23, 1997.

BAINY, A.C.D. et al. Oxidative stress in Gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquat. Toxicol.**, v. 34, p. 151-162, 1996.

BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* L. during dimethoate exposure. **Fd. Chem. Toxicol.**, v. 33, n. 5, p. 423-426, 1995.

BERGMMEYER, H.U.; SCHEIBE, P.; WAHLEFELD, A. W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine transferase. **Clin. Chem.**, v. 24, p. 58-73, 1978.

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

BIDINOTTO, P.M.; MORAES, G.; SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determination of micro samples. **Bol. Tec. CEPTA.**, n. 10, p. 53-60, 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, p. 920-926, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução N° 357**. Brasília, 17 mar. 2005. 23 p.

_____. Ministério da Saúde - MS. **Portaria N° 2.914**. Brasília, 12 dez. 2011. 34 p.

_____. Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. **Espécies cultivadas**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/especies-cultivadas>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Agrofit**. 2013. Disponível em: < http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 21 jan. 2013.

BRAGUINI, W. L. **Efeitos da deltametrina e do glifosato sobre parâmetros do metabolismo energético mitocondrial, sobre membranas artificiais e naturais e experimentos *in vivo***. 2005. 174 p. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2005.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo – Sistemática. In: BRANCO, S.M. **Poluição e piscicultura**, São Paulo: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai, USP, Faculdade de Saúde Pública; Instituto da Pesca de São Paulo, 1970. p. 79-108.

BROOKS, M.L. et al. Life histories, salinity zones, and sublethal contributions of contaminants to pelagic fish declines illustrated with a case study of San Francisco estuary, California, USA. **Estuar. Coasts.**, n. 35, p. 603-621, 2012.

BURR, S.A.; RAY, D.E.. Structure-activity and interaction effects of 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**, n. 306, p. 7-23, 2010.

CARNEIRO, F F. et al. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **ABRASCO**, Rio de Janeiro: 2012, v. 1, 98 p.

CARRASCHI, S.P. et al. Histopathological biomarkers in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected with *aeromonas hydrophila* and treated with antibiotics. **Ecotox. Environ. Saf.**, v. 83, p. 115-120, 2012.

CARRIQUIRIBORDE, P. et al. Global metabolic response in the bile of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces) sublethally exposed to the pyrethroid cypermethrin. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 76, p. 46-54, 2012.

CASIDA, J.E. et al. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 23, p. 413-438, 1983.

CENGIZ, E.I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 22, p. 200-204, 2006.

CENGIZ, E.I.; UNLU, E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the Gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 21, p. 246-253, 2006.

CHINN, K.; NARAHASHI, T. Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. **J. Physiol.**, n. 380, p. 191-207, 1986.

COPLEY, N.G. Alloxan and ninhydrin. **Analyst.** n. 66, p. 492-493, 1941.

CORTELLA, L.R.X. **Estresse oxidativo em matrinxã (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829, Characidae) exposto ao inseticida piretroide Keshet®**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

CRESCÊNCIO, R. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. *In*: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 23-36.

DANTAS, R.F. **Glutathione peroxidase e estresse oxidante em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2010. 101 p. Tese (Doutorado em Biociências) – Centro Biomédico, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

DATTA, M.; KAVIRAJ, A. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to freshwater catfish *Clarias gariepinus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 70, p. 296-299, 2003.

DEMOUTE, J.P. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. **Pestic. Sci.**, v. 27, p. 375-385, 1989.

DIEGUES, A.C. A Educação ambiental e a questão das áreas naturais protegidas. NÚCLEO DE APOIO À PESQUISA SOBRE POPULAÇÕES HUMANAS E ÁREAS ÚMIDAS BRASILEIRAS – NUPAUB. São Paulo, 1998. Disponível em: <www.usp.br/nupaub>. Acesso em: 10 jan. 2012.

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, p. 757-764, 2010.

DÓREA, J.G. Persistent, bioaccumulative and toxic substances in fish: human health considerations. **Scien. Total Environ.**, v.400, p. 93-114, 2008.

DORES, E.F.G.C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso, análise preliminar. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

DRABKIN, D.L. The standardization of hemoglobin measurement. **Am. J. Med. Sci.**, n. 215, v. 1, p. 110-111, 1948.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, n. 28, p.350-358, 1956.

DZIAMAN, R.; SITAREK, M.; KLYSZEJKO, B.. The effect of sublethal concentration of Decis 2.5 EC pesticide on learning and memory processes in common carp, *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). **Acta Ichthyol. Piscat.**, v. 40, n. 2, p. 145-154, 2010.

EDWARDS, R.; MILLBURN, P.; HUTSON, D.H. Comparative toxicity of *cis*-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. **Toxicol. App. Pharm.**, v. 84, p. 512-522, 1986.

ELLIOTT, M.. Properties and applications of pyrethroids. **Environ. Health Persp.**, v. 14, p. 3-13, 1976.

ELLIS, A.E.; ROBERTS, R.J. TYTLER, P. The anatomy and physiology of teleosts. In: ROBERTS, R.J. **Fish pathology**. 4. ed. UK: Wiley-Blackwell, 2012. p. 17-61.

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

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. **Environ. Toxicol. Pharm.**, v. 24, p. 212-217, 2007.

ERASLAN, G. et al. The effects of deltamethrin on some serum biochemical parameters in mice. **Pest. Biochem. and Physiology**, v. 87, p.123-130, 2007.

FIGUEIREDO, J.S.L. **Toxicidade aguda, efeitos metabólicos e hematológicos subletais do fenol em pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2008. 58 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

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

GLICKMAN, A. H. et al. *In Vitro* metabolism of permethrin isomers by carp and rainbow trout liver microsomes. **J. Agric. Food Chem.**, n. 27, p. 1038-1041, 1979.

GLICKMAN, A.H. et al. Elimination and metabolism of permethrin isomers in rainbow trout. **Toxicol. App. Pharm.**, v. 57, p. 88-98, 1981.

GLICKMAN, A.H.; LECH, J.J. Hydrolysis of permethrin, a pyrethroid insecticide, by rainbow trout and mouse tissues *in vitro*: a comparative study. **Toxicol. App. Pharm.**, v. 60, p.186-192, 1981.

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

GOLOW, A.A.; GODZI, T.A. Acute toxicology of deltamethrin and dieldrin to *Oreochromis niloticus* (LIN). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 52, p. 351-354, 1994.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimed Spearman-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Scien. Techonol.**, v. 7, p. 714-719, 1977.

HARATYM-MAJ, A. Hematological alternations after pyrethroids poisoning in mice. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 9, p. 199-206, 2002.

HARROWER, J.R.G.; BROWN, C.H. Blood latic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. **J. Appl. Physiol.**, n. 32 v.5, p. 224-228, 1972.

HASSPIELAR, B.M.; BEHAR, J.V.; DIGIULIO, R.T. Glutathione dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 28, p. 82-90, 1994.

HAYA, K. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 8, p. 381-391, 1989.

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.** n. 408, p. 4976-4983, 2010.

HOCHACHKA, P.W. et al. Metabolic biochemistry of water vs air breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 736-750, 1978.

HODGSON, E. **Textbook of modern toxicology**. 3. ed. EUA: John Wiley & Sons Publication, 2004.

HORI, T.S.F. et al. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. **Comp. Biochem. Physiol C.**, v. 143, p. 67-72, 2006.

HOSSAIN, M.M. et al. The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. **NeuroToxicol.**, n. 25, p. 825-833, 2004.

HOSSAIN, M.M. et al. Neuromechanical effects of pyrethroids, allethrin, cyhalothrin and deltamethrin on the cholinergic processes in rat brain. **Life Sci.**, n. 77, p. 795-807, 2005.

HUSAIN, R.; ADHAMI, V.M.; SETH, P.K. Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. **J. Toxicol. Environ. Health.**, n. 48, p. 515-526, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**: Brasil 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/default.shtm>>. Acesso em: 29 jul. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**: Brasil 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/default.shtm>>. Acesso em: 29 jul. 2012.

IMAMURA, L. et al. Deltamethrin, a pyrethroid insecticide, is a potent inducer for the activity-dependent gene expression of brain-derived neurotrophic factor in neurons. **J. Pharmacol. Exper. Therap.**, v. 316, n. 1, p. 136-143, 2006.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xilenol orange: comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids.**, v. 26, n. 10, p. 853-856, 1991.

KARASU BENLI, A.Ç. et al. Acute toxicity of deltamethrin on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.1758) larvae and fry. **G.U. J. Sci.**, v. 11, n. 1, p.1-4, 2009.

KHAN, A. et al. Effects os cypermethrin on some clinico-hemato-biochemical and pathological parameters in male dwarf goats (*Capra hircus*). **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 61, p. 151-160, 2008.

KÖPRÜCÜ, K.; AYDIN, R. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. **Pestic. Biochem, Physiol.**, n.80, p.47-53, 2004.

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. **Meth. Mol. Biol.**, n.32, p. 9-15, 1994.

KUMAR, S.; LATA, S.; GOPAL, K. Deltamethrin induced physiological changes in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 62, p. 254-258, 1999.

KUMAR, A. et al. λ -cyhalothrin and cypermethrin induced *in vivo* alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 93, p.96-99, 2009.

KUMAR, S. Mode of action of pyrethroid on energy dependent molecules and inorganic íons in *Clarias batrachus*. **Int. J. Biol. Ecol. Environ. Sci.**, v. 1, n.1, 2012.

KUMARAGURU, A.K.; BEAMISH, F.W.H. Bioenergetics off allimation to permethrin (NRDC-143) by rainbow trout. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 75C, p. 247-252, 1983.

LAYRARGUES, P. P. Do ecodesenvolvimento ao desenvolvimento sustentável: evolução de um conceito? **Proposta**, v. 25, n. 3, p. 5-10, 1997.

LEADEM, T.P.; CAMPBELL, R.D.; JOHNSON, D.W. Osmoregulatory responses to DDT and varying salinities in *Salmo gairdneri* – I. gill Na-K-ATPase. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 49A, p. 197-205, 1974.

LEBOULANGER, C. et al. Responses of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to paraquat and deltamethrin exposure. **Arch.Environ.Contam.Toxicol.**, v.56, p.39-51, 2009.

LIMA, A.O. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 4. ed., Guanabara Koogan, RJ,,1969.

LÓPEZ, O.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.G.; GIL, M.V. New trends in pest control: the search for greener insecticides. **Green Chem.**, n. 7, p. 431-442, 2005.

- LOURENCETTI, C. et al. Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: comparação entre métodos de previsão de lixiviação. **Pest. R. Ecotoxicol. M. Ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 1-14, 2005.
- LU, G.D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.**, n. 33, p. 249-254, 1939.
- LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Molec. Asp. Medic.**, v. 30, p. 42-59, 2009.
- LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat. Toxicol.**, v. 101, p. 13-30, 2011.
- MARIGOUDAR, S.R.; AHMED, R.N.; DAVID, M. Cypermethrin induced respiratory and behavioural responses of the freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Vet. Arhiv.**, v. 6, p. 583-590, 2009.
- MILAN, N. Colorimetric ultramicromethod for the determination of free fatty acids. **J. Lipid Res.**, n. 6, p. 431-433, 1965.
- MORAES, F.D. **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque, 1818) exposto a concentração sub-letal de fenol e recuperação**. 2009. 92 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- 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.
- 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.
- MUSHIGERI, S.B.; DAVID, M. Fenvalerate induced changes in the Ach and associated AchE activity in different tissues of fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) under lethal and sublethal exposure period. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 20, p. 65-72, 2005.
- NAGASAKA, R.; OKAMOTO, N.; USHIO, H. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 139, p. 259-266, 2004.
- NARAHASHI, T.. Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. **Neurotoxicology**, n. 6, p. 3-22, 1985.
- NARAHASHI, T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. **Pharm. Toxicol.**, v. 78, p. 1-14, 1996.
- NICHOLS, J.W.; SCHLTZ, I.R.; FITZSIMMONS, P.N. In vitro-in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish: I. A review of methods, and strategies for

incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models. **Aquat. Toxicol.**, v. 78, p.74-90, 2006.

OLIVEIRA, C. et al. Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. **Aquat. Toxicol.**, v. 124, p. 209-216, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Deltamethrin. **Environmental Health Criteria** 97., Geneva, 1990. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm>>. Acesso em: 29 jul. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. World malaria report. **World global malaria programme**. 2010.

ORELLANA, M.; GUAJARDO, V. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. **Ver. Méd. Chile.**, v. 132, p. 85-94, 2004.

PARVEZ, S.; SAYEED, I.; RAISUDDIN, S. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 65, p. 62-66, 2006.

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. Pollut. Bull.**, v. 32, n. 2; p. 225-231, 1996.

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.

PRASHANTH, M.S.; DAVID, M. Impact of cypermethrin on Na⁺-K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ATPases in Indian major carp, *Cirrhinus mrigada* (Hamilton). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 84, p. 80-84, 2010.

PROUX, J. et al. Deltamethrin-induced deregulation of the water balance in the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106C, n. 2, p.351-357, 1993.

QUABIUS; E.S.; BLAM, P.H.M.; BONGA, S.E.W. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 108, p. 472-482, 1997.

RAHIMI, R.; ABDOLLAHI, M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 88, p. 115-121, 2007.

RAND, G.M. Fish toxicity studies. In: DI GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The toxicology of fishes**. Londres: Taylor & Francis, 2008. p. 659-679.

REGOLI, F. et al. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Mar. Environ. Res.**, v. 54, p. 419-423, 2002.

- 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. 105S, p. 56-66, 2011.
- REPETTO, R.; BALIGA, S.S.. Pesticides and the immune system: the public health risks. **WRI**, 109 p., 1996. Disponível em: < http://pdf.wri.org/pesticidesandimmunesystem_bw.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2013.
- ROBERTSON, P. et al. A new generation of biocides for control of crustacean in fish farms. **Jour. Photochem. Photobiol. B: Biology.**, v. 95, p. 58-63, 2009.
- 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, p. 1254-1259, 2008.
- SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R.. Piretroides: uma visão geral. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 18, n. 13, p. 339-349, 2007.
- SAOUDI, M. et al. Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 74, p. 1765-1769, 2011.
- SARMA, K. et al. Biochemical and histological changes in the brain tissue of spotted murrel, *Channa punctatus* (Bloch), exposed to endosulfan. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 36, p. 597-603, 2010.
- 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.
- SCOTT, G.R.; SLOMAN, K.A.. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquat. Toxicol.**, n. 68, p. 369-392, 2004.
- SEPICI-DINÇEL, A. et al. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: biochemical, hematological, histopathological alterations. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 72, p.1433-1439, 2009.
- SEVATDAL, S.; HORSBERG, T.E.. Determination of reduced sensitivity in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Kroyer) against the pyrethroid deltamethrin using bioassays and probit modeling. **Aquaculture**, n. 218, p. 21-31, 2003.
- SHEPHARD, K.L. Functions for fish mucus. **Rev. Fish Biolo. Fisher**, v. 4, p. 401-429, 1994.
- SHOUBRIDGE, E.A.; HOCHACHKA, P. Ethanol: novel endproduct of vertebrate anaerobic metabolism. **Science**, v. 209, p. 308-309, 1980.
- SILVA DE ASSIS, H.C. et al. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 6, p. 1401-1407, 2009.

SINGH, N.N.; SRIVASTAVA, A.N. Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 838-854, 2010.

SODERLUND, D.M.; BLOOMQUIST, J.R.. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Ann. Rev. Entomol.**, n. 34, p. 77-96, 1989.

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

SOLÉ, M. et al. Esterases activities and lipid peroxidation levels in muscle tissue of the shanny *Lipophrys pholis* along several sites from the Portuguese coast. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 56, p. 999-1007, 2008.

SRIVASTAV, A.K.; SRIVASTAVA, S.K.; SRIVASTAV, S.K. Impact of deltamethrin on serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 59, p. 841-846, 1997.

STAAL, G.E.; KOSTER, J.F.L.; VEGGER, C. Human erythrocyte pyruvate kinase. **Methods Enzymol.**, v. 42, p. 182-186, 1975.

STEVENSON, B.J. et al. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: sequential metabolism of deltamethrin revealed. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, p.1-11, 2011.

SUVETHA, L.; RAMESH, M.; SARAVANAN, M. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and Gill Na⁺/K⁺-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 haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Vet. BRNO**, v. 72, p. 79-85, 2003.

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

TAYLOR, P. The cholinesterases. **J. Biolog. Chem.**, v. 266, n. 7, p. 4025-4028, 1991.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, n. 34, p. 281-320, 1994.

TIERNEY, K.B. et al. Olfactory toxicity in fishes. **Aquat. Toxicol.**, v. 96, p. 2-26, 2010.

THOMAS, C. et al. Effects of river water and salinity on the toxicity of deltamethrin to freshwater shrimp, cladoceran, and fish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 55, p. 610-618, 2008.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 6, p. 24, 1969.

US-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Reregistration eligibility decision for pyrethrins**. 2006. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/pyrethrins_red.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2012.

URAL, M.S.; SAGLAM, N. A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 83, p. 124-131, 2005.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B., GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 225-246.

VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 64, p. 178-189, 2006.

van der OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E.. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharm.**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VANI, T. et al. Deltamethrin induced alterations of hematological and biochemical parameters in fingerlings of *Catla catla* (Ham.) and their amelioration by dietary supplement of vitamin C. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 101, p. 16-20, 2011.

VANI, T. et al. Alterations in haematological and biochemical parameters of *Catla catla* exposed to sub-lethal concentration of cypermethrin. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 1577-1584, 2012.

VELISEK, J. et al. Effect of deltamethrin on the biochemical profile of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bull. Environ. Cont. Toxicol.**, v. 76, p. 992-998, 2006.

VELISEK, J. et al. Effects os deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environ.Toxicol.Pharmacol.**, v. 23, p. 297-301, 2007.

VELISEK, J.; STARA, A.; SVOBODOVA, Z. The effects of Pyrethroid and Triazine pesticides on fish physiology. In: STOYTCHIEVA, M. **Pesticides in the modern world: pests control and pesticides exposure and toxicity**. InTech, 2011. p. 377-402. Disponível em:<<http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-pests-control-and-pesticides-exposure-andtoxicity-assessment/the-effects-of-pyrethroid-and-triazine-pesticides-on-fish-physiology>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

VENTURINI, F.P. **Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposto a concentração sub-letal de triclofon e recuperação**. 2010. 78 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

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

VIJVERBERG, H.P.M.; van der BERCKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 21, p. 105-126, 1990.

VIRAN, R. et al. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 55, p. 82-85, 2003.

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, p. 614-620, 2006.

YOUSEF, M.I.; AWAD, T.I.; MOHAMED, E.H. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by vitamin E. **Toxicol.**, v. 227, p. 240-247, 2006.

WHEELLOCK, C.E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **J. Pestic. Sci.**, v. 30, n.2, p. 75-83, 2005.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecol. Econ.**, n. 39, p. 449-462, 2001.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. **Free Rad. Biol. Medic.**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.