

**OFÍCIO PPGGEv N° 006/2015**

São Carlos, 05 de fevereiro de 2016.

Prezado Prof. Dr. Gilberto Moraes,

Convidamos Vossa Senhoria para participar da Banca de Defesa ao Mestrado da aluna CAMILA APARECIDA PIGÃO SOARES, composta da seguinte maneira:

**MEMBROS TITULARES:**

Prof. Dr. Gilberto Moraes – UFSCar/São Carlos (Presidente)

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho – UFSCar/São Carlos

Dra. Francine Perri Venturini – USP/São Carlos

**MEMBROS SUPLENTEs:**

Dr. Marcelo Gustavo Paulino – UFSCar/São Carlos

Dr. Eduardo Alves de Almeida – UNESP

Informamos que a aluna apresentará trabalho com o título: Estudo de indicadores de estresse em *Brycon amazonicus* (matrinxã) exposto a deltametrina (Keshet®). Agradecendo antecipadamente a colaboração de Vossa Senhoria, cordialmente subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes

Coordenadora do PPGGEv

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Departamento de Genética e Evolução

**Estudo de indicadores de estresse em *Brycon amazonicus*  
(matrinxã) exposto a deltametrina (Keshet®)**

**Camila Aparecida Pigão Soares**

**São Carlos**

**-2016-**

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Departamento de Genética e Evolução

**Estudo de indicadores de estresse em *Brycon amazonicus*  
(matrinxã) exposto a deltametrina (Keshet®)**

**Camila Aparecida Pigão Soares**

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 em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Cordeiro Borra

**São Carlos**

**-2016-**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S676e Soares, Camila Aparecida Pigão  
Estudo de indicadores de estresse em *Brycon amazonicus* (matrinxã) exposto a deltametrina (Keshet®) / Camila Aparecida Pigão Soares. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
70 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Deltametrina. 2. Piretroides. 3. Metabolismo intermediário. 4. *B. amazonicus*. 5. Sistema colinérgico. I. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Aparecida Pigão Soares, realizada em 25/02/2016:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Gilberto Moraes', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Gilberto Moraes  
UFSCar

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Orlando Moreira Filho', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho  
UFSCar

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Francine Perri Venturini', written over a horizontal line.

Profa. Dra. Francine Perri Venturini  
USP

*Dedico este trabalho àqueles que sempre me apoiaram:*

*Meus pais, Antônio e Gilmara,*

*minha irmã Carolina*

*e meu noivo Sílvio.*

*É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se aos pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.*

*Theodore Roosevelt*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes pela oportunidade de poder fazer parte de uma equipe maravilhosa e por ter aceitado me orientar nesta trajetória. Suas sábias palavras sempre trouxeram paz.

Ao Prof. Dr. Ricardo Borra, pela competente co-orientação.

Aos componentes da banca, pelas valiosas contribuições.

À querida Ive, que me apresentou à pesquisa e me ensinou valiosas lições.

À Fernanda, pela amizade e por toda paciência, apoio e ajuda sempre que precisei.

Aos amigos do laboratório de bioquímica: Francine, Fernando, Araceli, Priscila, Gustavo e Luciana, pelos momentos compartilhados e por me ajudarem e me aguentarem todo esse tempo.

Aos queridos Sr. Toninho e Piau, sem os quais este trabalho não seria possível.

Aos meus familiares, meu pai Antônio, minha mãe Gilmara, minha irmã Carolina, minha tia Vera, por todo carinho e dedicação.

Ao meu noivo, por me apoiar e entender minhas ausências.

À minha grande amiga Carol (Anna) por estar sempre ao meu lado nesses últimos sete anos me ouvindo, me ajudando e me fazendo rir, a você meu muitíssimo obrigada.

À minha “amiga-irmã” Gabi (Biziz) por todas as palavras amigas, por todos os conselhos e por sempre abrir meus olhos e acalmar meu coração.

Aos meus queridos amigos Marco e Thaianne, pela amizade, carinho e companheirismo. Vocês fizeram os meus dias em São Carlos serem inteiros.

À Piscicultura Polletini, por fornecerem os animais para o experimento.

Às secretárias Juliana e Ivanildes, pela gentileza e eficiência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, pelos conhecimentos transmitidos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos,

**MUITO OBRIGADO!**



## Resumo

Nos últimos 40 anos, o consumo nacional de agrotóxicos aumentou 700%, fazendo do Brasil um dos maiores consumidores desse tipo de compostos no mundo. Dentre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil estão os piretroides, um grupo de inseticidas muito utilizados por ter alta estabilidade à luz e não sofrer bioacumulação na cadeia trófica. A deltametrina é um piretróide, classificado como medianamente tóxico e pode funcionar como um interruptor endócrino sendo amplamente utilizado nas lavouras e na conservação de produtos estocados. Os piretroides possuem baixa toxicidade aos mamíferos e aves. Contudo, estudos recentes apontam sua nocividade a organismos aquáticos, tais como os peixes. A alta toxicidade dos piretroides aos peixes pode estar relacionada aos danos causados ao sistema nervoso e aos mecanismos de metabolização desse xenobiótico. Uma forma de monitorar os efeitos dos agrotóxicos no meio ambiente é através de biomarcadores, como as colinesterases e os intermediários metabólicos, como glicose, cortisol e lactato. Assim, foi feito nesse trabalho um experimento *in vivo* com *B. amazonicus* exposto por 96h a 20%, 40% e 60% da CL/50 96h de deltametrina (Keshet®), e um experimento *in vitro* com o *B. amazonicus* exposto por uma hora a deltametrina na formulação analítica (Pestanal®). Após a exposição os peixes foram anestesiados para retirada de sangue e posteriormente abatidos para retirada de: cérebro, fígado, intestino, brânquias e músculo branco. De acordo com os resultados observados, no fígado houve aumento dos níveis de glicose, proteína e amônia, enquanto no plasma houve aumento das concentrações de aminoácidos e amônia. Em contrapartida, os níveis de glicogênio caíram no fígado, assim como os níveis de lactato do plasma. No músculo observou-se redução nos níveis de proteína e aminoácidos e aumento de amônia, glicose e lactato. Com relação aos parâmetros enzimáticos observou-se inibição da colinesterase cerebral “*in vivo*” e “*in vitro*”, enquanto a CbE apresentou inibição nas brânquias e intestino e aumento da atividade no músculo e plasma. As atividades enzimáticas de ALAT E ASAT aumentaram no fígado enquanto a LDH apresentou inibição. Sendo assim, podemos concluir que o *B. amazonicus* apresentou alterações do metabolismo intermediário no sentido de suprir a demanda energética causada pelos processos de intoxicação causada pela deltametrina. E apresentou inibição da colinesterase, tal como esperado, além de

apresentar atividade da CbE evidenciando a tentativa de degradar a deltametrina. Podemos assim afirmar que *Brycon amazonicus* exposto à deltametrina responde bioquimicamente à intoxicação através de respostas adaptativas que o permitem inicialmente escapar aos efeitos tóxicos do meio contaminado por esse xenobiótico.

Palavras-Chaves: Deltametrina, Piretroides, Metabolismo intermediário, *B. amazonicus*, Sistema colinérgico, Colinesterase, Carboxilesterase, Biomarcadores.

## Abstract

In the last 40 years, the use of pesticides increased 700% in Brazil, setting this country into the very consumers of this kind of chemicals in the world. There among the most used pesticides in Brazil are the pyrethroids, a class of insecticides largely used for the stability to light rays and being not accumulated in the trophic chain. Deltamethrin is a pyrethroid classified as moderately toxic and it may work as endocrine disruptor. It is widely used in the farms and preserving stocked foods. Pyrethroids are low toxic to mammals and birds. Although, new studies pointed out their noxiousness to aquatic organisms such as fishes. The high toxicity of pyrethroids to fishes may be related to damages caused to nervous system and to their mechanisms of biochemical degradation. Biomarkers are a way of monitoring the pesticides effects on the environments. Among them, cholinesterases and metabolites such as glucose, cortisol and lactate can be used. In the present monography is reported a work carried out *in vivo* with matrinxa exposed to deltamethrin (Keshet®) at 20, 40 and 60% of CL50:96h for 96 hours, and other *in vitro* with matrinxa exposed to the analytical formulation of deltamethrin (Pestanal®). After the pesticide exposure, fish were anesthetized, blood was withdrawn and then the fish were killed for brain, liver, gut, gills and white muscle excision. From the observations we can say that glucose, protein and ammonia were increased in liver, and amino acids and ammonia were increased in plasma. The glycogen bulks of liver and plasma lactate were decreased. In white muscle, protein and amino acids levels were decreased, and ammonia, glucose and lactate increased. Concerning the studied enzymes, it was observed inhibition of brain AChE *in vivo* and *in vitro* activities while CbE was inhibited in the gills and gut but increased in white muscle and plasma. The enzyme activities of ALAT and ASAT increased in liver and LDH activity was reduced. Therefore, we may conclude that matrinxa presented metabolic changes in order to supply the energetic demand caused by deltamethrin poisoning. The inhibition of AChE was observed, as expected, in addition to CbE increase, showing the activation of mechanisms to degrade deltamethrin. It is possible to assert that *Brycon amazonicus* exposed to deltamethrin is biochemically responsive to the poisoning using adaptive strategies which enable it to escape from toxic effects of a contaminated environment by such xenobiotic.

Key words: Deltamethrin, Pyrethroids, intermediate metabolism, *B. amazonicus*, cholinergic system, acetylcholinesterase, carboxylesterase, Biomarkers.

## **Lista de abreviaturas e siglas**

ACh – Acetilcolina  
AChE – Acetilcolinesterase  
ALAT – Alanina Aminotransferase  
ASAT – Aspartato Aminotransferase  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CbE – Carboxilesterase  
Cl<sup>-</sup> - Íons Cloreto  
ChAT – Colina Acetil Transferase  
CL50 – Concentração letal para 50% da população  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
DDT - Diclorodifeniltricloroetano  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
DTNB - (5,5-ditiobis)-2-ácido nitro benzoico  
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio  
FAC – Fosfatase Ácida  
FALC – Fosfatase Alcalina  
LDH – Lactato Desidrogenase  
MAPA- Ministério da agricultura, Pecuária e abastecimento  
MDH – Malato Desidrogenase  
MMA – Ministério do Meio Ambiente  
MS – Ministério da Saúde  
NAD – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio  
NADH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio (Reduzida)  
OP - Organofosforados  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SNP – Sistema Nervoso Periférico  
TCA – Ácido Tricloroacético  
VAcHT- Transportador vesicular de ACh  
USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

## Lista de Figuras e Gráficos

<b>Figura 1:</b> Caminho percorrido pelos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos.....	5
<b>Figura 2:</b> Formula estrutural da Permetrina, piretroide Tipo I.....	7
<b>Figura 3:</b> Formula estrutural da Cipermetrina, piretroide Tipo II.....	8
<b>Figura 4:</b> A ação dos piretroides sobre os canais de sódio. Os piretroides do tipo I levam a uma séria de potencias de ação, já no caso dos piretroides do tipo II, estes provocam uma menor amplitude do potencial de ação.....	9
<b>Figura 5:</b> Formula estrutural da Deltametrina, piretroide Tipo II.....	10
<b>Figura 6:</b> <i>Brycon amazonicus</i> , o popular matrinxã, peixe alvo deste estudo.....	18
<b>Figura 7:</b> Esquema do desenho experimental de exposição ambiental de matrinxã ao xenobiótico deltametrina na formulação Keshet® nas concentrações de 20%, 40% e 60% da CL/50 96h.....	22
<b>Figura 8, 9 e 10:</b> Concentração de amônia no plasma, fígado e músculo branco de <i>B. amazonicus</i> exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).....	29
<b>Figura 11, 12 e 13:</b> Concentração de aminoácidos no plasma, fígado e músculo branco de <i>B. amazonicus</i> exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).....	30
<b>Figura 14, 15 e 16:</b> Concentração de glicose no plasma, fígado e músculo branco de <i>B. amazonicus</i> exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).....	30
<b>Figura 17 e 18:</b> Concentração de Glicogênio no fígado e músculo branco de <i>B. amazonicus</i> exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).....	31

<b>Figura 19, 20 e 21:</b> Concentração de lactato no plasma, fígado e músculo branco de <i>B. amazonicus</i> exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).....	32
<b>Figura 22, 23 e 24:</b> Concentração de proteína no plasma, fígado e músculo branco de <i>B. amazonicus</i> exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).....	32
<b>Figura 25 e 26:</b> Atividade específica da enzima Alanina aminotransferase hepática e muscular de <i>B. amazonicus</i> exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).....	33
<b>Figura 27 e 28:</b> Atividade específica da enzima aspartato aminotransferase hepática e muscular de <i>B. amazonicus</i> exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).....	34
<b>Figura 29 e 30:</b> Atividade específica da enzima lactato desidrogenase hepática e muscular de <i>B. amazonicus</i> exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).....	35
<b>Figura 31 e 32:</b> Atividade específica da enzima acetilcolinesterase cerebral e muscular de <i>B. amazonicus</i> exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).....	36
<b>Figura 33, 34, 35, 36, 37 e 38:</b> Atividade específica da enzima carboxilesterase plasmática, cerebral, hepática, muscular, branquial e intestinal de <i>B. amazonicus</i> exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).....	37
<b>Figura 39 e 40:</b> Inibição da atividade específica de acetilcolinesterase cerebral e muscular de <i>B. amazonicus</i> por deltametrina 0,001mM. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).....	38

<b>Figura 41:</b> Mapa metabólico geral.....	44
----------------------------------------------	----

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Média dos parâmetros de qualidade da água após 96 horas de exposição à deltametrina.....	23
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

# Sumário

1	Introdução.....	1
2	Revisão bibliográfica.....	4
2.1	O uso de agrotóxicos .....	4
2.2	Piretroides .....	6
2.3	Deltametrina .....	9
2.4	Biomarcadores .....	12
2.4.1	Biomarcadores bioquímicos .....	14
2.4.1.1	Sistema Colinérgico .....	15
2.4.1.2	Carboxilesterase .....	16
2.5	Matrinxã .....	17
<b>3</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>21</b>
4.1	Experimento " <i>In vivo</i> " .....	21
4.2	Parâmetros de qualidade de água .....	22
4.3	Intermediários Metabólicos .....	23
4.3.1	Proteína Total .....	23
4.3.2	Glicose .....	24
4.3.3	Lactato .....	24
4.3.4	Glicogênio .....	24
4.3.5	Aminoácidos livre .....	25
4.3.6	Amônia .....	25
4.3.7	Alanina aminotransferase (ALAT).....	25
4.3.8	Aspartato aminotransferase (ASAT).....	25
4.3.9	Lactato desidrogenase (LHD).....	25
4.4	Esterases .....	26
4.4.1	Colinesterase .....	26

4.4.2 Carboxilesterase (CbE) .....	26
4.5 Experimento "In vitro" do efeito da deltametrina (Pestanal®).....	27
4.5.1 Colinesterase Muscular e Cerebral .....	27
4.6 Estatística .....	28
<b>5 Resultados .....</b>	<b>29</b>
5.1 Metabolismo .....	29
5.1.1 Amônia .....	29
5.1.2 Aminoácidos livres .....	29
5.1.3 Glicose .....	30
5.1.4 Glicogênio .....	31
5.1.5 Lactato .....	31
5.1.6 Proteína .....	32
5.1.7 Alanina aminotransease (ALAT).....	33
5.1.8 Aspartato aminotransease (ASAT).....	33
5.1.9 Lactato desidrogenase (LDH).....	34
5.2 Esterases .....	35
5.2.1 Colinesterase .....	35
5.2.2 Carboxilesterase .....	36
5.4 Experimento "In vitro" do efeito da deltametrina (Pestanal®).....	37
5.4.1 Atividade colinesterásica e ação do Pestanal® .....	37
<b>6 Discussão .....</b>	<b>39</b>
6.1 Metabolismo .....	39
6.2 Esterases .....	45
6.2.1 Atividade Colinesterásica .....	45
6.2.2 Carboxilesterase .....	47
6.3 Experimento "In vitro" do efeito da deltametrina (Pestanal®).....	48
<b>7 Conclusão.....</b>	<b>50</b>

<b>8 Referências bibliográficas .....</b>	<b>51</b>
-------------------------------------------	-----------

## 1 Introdução

Os agrotóxicos foram criados logo após a segunda guerra mundial, disseminaram-se rapidamente pelo mundo e se tornaram a esperança no combate a fome (TERRA, 2008). Um dos primeiros pesticidas introduzidos na agricultura foi o DDT, um organoclorado de alta estabilidade que se acumulava no tecido adiposo dos animais, e que portava alta capacidade de biomagnificação na cadeia trófica (CIRCUNVIS, 2010). Por esses motivos vários países proibiram o uso desse inseticida, inclusive o Brasil nos anos 90, com a promulgação da Lei nº 7.802, de 1989 (LUCCHESI, 2005).

No Brasil a instalação das primeiras indústrias de agrotóxicos ocorreu por volta de 1940. O parathion foi o primeiro inseticida introduzido no país, entretanto, foi apenas na década de 70 que a implantação dessas indústrias se deu efetivamente e desde então o consumo de agrotóxicos aumentou cerca de 700% (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2011). Só nos últimos três anos o consumo de agrotóxicos no país cresceu 13% ao ano, sendo que em 2012 o Brasil consumiu 823,2 toneladas das quais 36% foram importadas. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), em 2013 o Brasil foi considerado o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, consumindo mais do que países como os Estados Unidos.

No Brasil os agrotóxicos são classificados quanto a sua toxicidade aos seres humanos, pelo decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990, em quatro classes: Classe I – extremamente tóxicos (Faixa Vermelha); Classe II – altamente tóxico (Faixa Amarela); Classe III – medianamente tóxico (Faixa Azul) e; Classe IV – pouco tóxico (Faixa Verde). Entretanto, esta classificação pode sofrer alteração em função de sexo, idade, condições nutricionais e da via de intoxicação do indivíduo (CALVALVANTE, 2000). O Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece em seus incisos XX - XXII o uso de agrotóxicos em lavouras. Segundo estes incisos, deve haver um intervalo entre as aplicações e a entrada de pessoas nas áreas tratadas, contudo, não é definido qual é este intervalo. Além disso, os incisos XX-XXII limitam a quantidade máxima de resíduos de agrotóxicos em alimentos, quando aplicados corretamente, da produção até o consumo.

Atualmente os inseticidas mais utilizados são os piretroides, tais como a deltametrina e a cipermetrina, que são compostos feitos a base de ésteres tóxicos isolados do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (SANTOS *et al*, 2007). Inicialmente as piretrinas são naturais e, portanto, de baixa estabilidade na luz, sendo dessa forma ineficazes nas lavouras e no combate a insetos vetores como os da malária e a da dengue. Com o crescimento populacional desenfreado, a demanda nutricional e comercial aumentou exponencialmente, bem como a fome em países subdesenvolvidos. Dessa forma surgiu a necessidade de técnicas que aumentassem e melhorassem a atividade agrícola no mundo. A saída para tal problema foi, portanto, intensificar o uso de defensivos agrícolas nas lavouras. Assim, foram desenvolvidas as piretrinas sintéticas que passaram a possuir na sua composição átomos de nitrogênio, enxofre e halogênios, que mantinham a baixa toxicidade aguda para mamíferos e aves e aumentavam a estabilidade à luz (SANTOS *et al*, 2007).

Em outros países os piretroides são registrados para o controle de parasitas na produção agrícola, no controle de insetos vetores, na segurança domissanitária e para o controle de ectoparasitas em peixes. No Brasil são muito utilizados na lavoura e no controle de insetos vetores de doenças como a dengue, e apesar de ser usado na piscicultura, o seu uso não é regulamentado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; SEPA, 1998; HAYA, 2005). De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), em sua resolução 357/2005 (BRASIL, 2005a), não há limites estabelecidos para piretroides em água doce. Apenas o Ministério da Saúde (MS) estabelece uma concentração máxima permitida de permetrina em água potável, estipulada em  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (BRASIL, 2005b). Contudo, outros piretroides, principalmente os da classe II, estão sendo amplamente utilizados e registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O Brasil, dentre os países do Mercosul, é o que possui as normas mais rígidas para comercialização de defensivos agrícolas, entretanto apresenta insuficiência na fiscalização tanto da venda quanto do uso desses compostos.

O Brasil apresenta uma ictiofauna de água doce extremamente variada, e a criação de peixes é um ramo que vêm crescendo exponencialmente nos últimos anos por causa do gosto agradável da carne, pelo seu alto teor de ômega 3 e por ser

uma carne com maior teor proteico e menor teor de gorduras. Os peixes estão sendo muitos utilizados para avaliar a qualidade da água, pois são sensíveis as alterações no meio ambiente (TISER & ZAGORC-KONCAN, 1997; BRASIL, 2007).

Os peixes são personagens chave na evolução dos vertebrados, práticas da aquicultura que incluem a exposição dos peixes a baixa qualidade de água, xenobióticos e manuseio inapropriado induzem ao estresse, que é caracterizado por alterações fisiológicas, metabólicas, hormonais e distúrbios osmóticos (SCHLENK *et al.*, 1999). A presença de doses subletais de agente tóxicos na água tem sido reportada como fator importante no desenvolvimento de doenças infecciosas em peixes. Quantidades significativas de xenobióticos têm sido encontradas no intestino de peixes bentônicos, sendo que a principal fonte de contaminantes é através de partículas acumuladas no sedimento ou de alimentos contaminados (MALINS *et al.*, 1984; GOSSET *et al.*, 1983 *apud de* LAVOR, 2008). Sabe-se que a exposição a xenobióticos causa injurias teciduais e consequentes disfunções nos órgãos que afetam o bem-estar animal, podendo levar o animal a morte (AVILEZ, 2008).

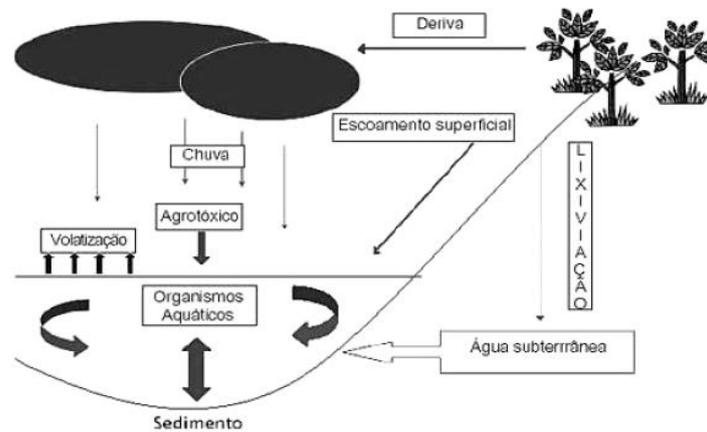
## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 O uso de agrotóxicos

Segundo Decreto nº 4.074, artigo 1º, inciso IV – 04/01/2002, agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

A utilização de agrotóxicos na agricultura é vista atualmente como de extrema importância para o desenvolvimento das lavouras, isso fez com que o Brasil passasse a ocupar o primeiro lugar no ranking dos países que mais utilizam agrotóxicos nas lavouras. Esse crescimento no consumo de agrotóxicos não foi acompanhado pelo aumento nas áreas cultivadas, indicando a utilização de maiores quantidades de produto por área plantada (WILLSON & TISDELL, 2001). Entretanto, o uso desenfreado desses compostos está causando a contaminação do ambiente aquático essencialmente pela lavagem do solo, ou lixiviação, pela água da chuva e água de irrigação, facilitada pela destruição das matas ciliares que protegem os cursos dos rios pelos próprios agricultores (Figura 1). No entanto, a contaminação pode ocorrer também pela aplicação direta de agrotóxicos na água para controle de vetores e através da pulverização por aviões agrícolas (DORES & FREIRE, 2001; CÁCERES *et al*, 1981; HUSSAR *et al*, 2004).

**Figura 1:** Caminho percorrido pelos agrotóxicos em ecossistemas aquáticos.



Fonte: Adaptado de NIMMO, 1985.

O Brasil possui 434 ingredientes ativos e 2400 formulações de agrotóxicos registradas no Ministério da Saúde, Ministério da Pecuária, Agricultura e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente (MMA), sendo que dos 50 produtos mais utilizados no país, 22 são proibidos na União Europeia (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012). O uso errôneo de inseticidas na agricultura pode causar problemas de intoxicação nos trabalhadores rurais que manipulam e aplicam esses produtos. O risco dessa contaminação afeta também os consumidores dos produtos cultivados, os animais domésticos, os alimentos como frutas e legumes, os recursos hídricos e o ecossistema como um todo (SANTO, 1996; WILLSON & TISDELL, 2001).

Piscicultores estão fazendo uso de defensivos agrícolas nas suas pisciculturas para controlar parasitoses que podem acometer os peixes causando efeitos negativos no desenvolvimento e crescimento destes e muitas vezes não utilizam produtos específicos para tal proposta. Entretanto, o que esses produtores não têm consciência é que a adição desses compostos na água aumenta a debilidade do animal, contribuindo para a mortandade dos cardumes e para o aumento da poluição ambiental (KUBITZA & KUBITZA, 1999).

Outro problema enfrentado pelo uso intensivo de agrotóxicos nas lavouras é a criação de cepas resistentes a esses compostos como ocorreu com o pulgão da batata (*Myzus persicae*), uma praga das plantações da batata do Brasil (FURIATTI,

2000). Essa resistência faz com que os agricultores utilizem mais para controlar essas cepas resistentes, o que culminará com o surgimento de novas cepas resistentes e assim por diante. Esse “feedback positivo” atingirá os corpos d’água de várias formas causando aumento do processo de poluição ambiental, e conseqüentemente gerando efeitos danosos nos organismos não alvos como peixes e crustáceos (WHO, 1990).

Devido aos problemas já mencionados e visando o desenvolvimento sustentável, nos últimos anos está havendo maior procura por agrotóxicos que apresentem menor persistência no meio ambiente, cujas moléculas apresentam rápida degradação ambiental, e menor toxicidade a mamíferos e aves. Dessa forma os piretroides e os neonicotinóides estão sendo vistos com uma alternativa ao uso dos organoclorados, organofosforados e carbamatos que são altamente tóxicos (SANTOS, 1996; MORAES, 2013).

## **2.2 PIRETROIDES**

As primeiras piretrinas utilizadas na agricultura eram naturais e de baixa estabilidade na luz, e assim apresentavam baixa eficácia no controle de pragas encarecendo o processo de desinfecção já que os agricultores eram obrigados a aplicar o produto no cultivo mais vezes que o recomendável. Foram desenvolvidas assim as piretrinas sintéticas, que passaram a possuir na sua composição átomos de nitrogênio, enxofre e halogênios, que mantinham a baixa toxicidade aguda para mamíferos e aumentavam a estabilidade à luz (SANTOS *et al.*, 2007).

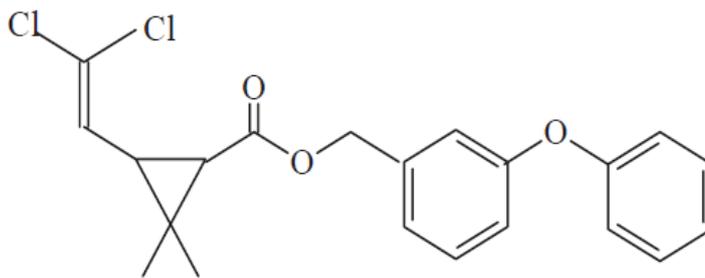
Com o aumento da demanda agrícola, a aplicação de piretroides aumentou consideravelmente; contudo, com o tempo seu uso indiscriminado surtiu efeitos danosos ao meio ambiente, sendo os organismos aquáticos os mais afetados por essa atividade (WHO, 1990).

Em mamíferos, os piretroides sofrem a biotransformação hepática, pela clivagem da ligação éster, provavelmente por carboxilesterases, seguida por reações de hidroxilação através do sistema de monooxigenases hepáticas ligadas ao citocromo P-450 e de várias reações de conjugação (HIEDER, 2001). A formação de metabólitos primários e secundários na biotransformação de um piretroide, resulta no aumento significativo de sua solubilidade em água, facilitando assim sua excreção na urina (KALE *et al.*, 1999). Em peixes, a reação da clivagem da ligação

éster parece ser deficiente pela falta da carboxilesterases e baixa taxa de biotransformação (HAYA, 1989). Além disso, os piretroides têm caráter lipofílico e são rapidamente absorvidos pelas brânquias, causando danos metabólicos, fisiológicos e neurológicos graves (PIMPÃO, 2006).

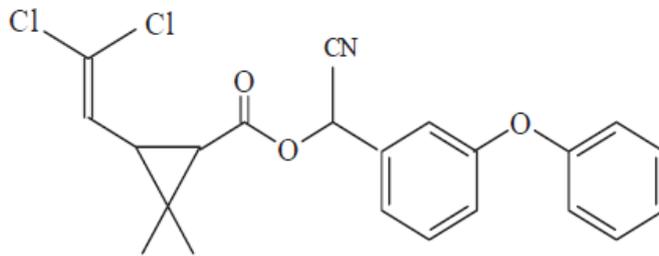
Atualmente existem dois tipos de piretroides sendo comercializados, o tipo I e o tipo II. Os piretroides do tipo I, como permetrina (Figura 2) e aletrina, que não possuem um grupo alfa-ciano e parecem agir principalmente nos nervos periféricos causando a Síndrome do Envenenamento tipo I ou “Síndrome T”. Tal síndrome caracteriza-se por induzir, em ratos, tremores por todo corpo, comportamento agressivo, aumento da sensibilidade aos estímulos externos, hiperexcitabilidade e convulsões além, de paralisia progressiva em mamíferos não roedores. Já os incluídos no tipo II como a deltametrina e a cipermetrina (Figura 3), possuem um grupo alfa-ciano e agem no sistema nervoso central induzindo a Síndrome da Coreoatetose tipo II ou “Síndrome CS” cujos sintomas de intoxicação em ratos são: hipersensibilidade, salivação abundante, agitação das patas anteriores, movimentos de escavar e tremores periódicos que podem evoluir à coreoatetose e, em alguns casos, a movimentos crônicos repetitivos (VERSCHOYLE, 1980; CANTALAMESSA, 1993; NARAHASHI, 1996; SPENCER, 2001).

**Figura 2:** Fórmula estrutural da Permetrina, piretroide Tipo I.



Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

**Figura 3:** Fórmula estrutural da Cipermetrina, piretroide Tipo II.



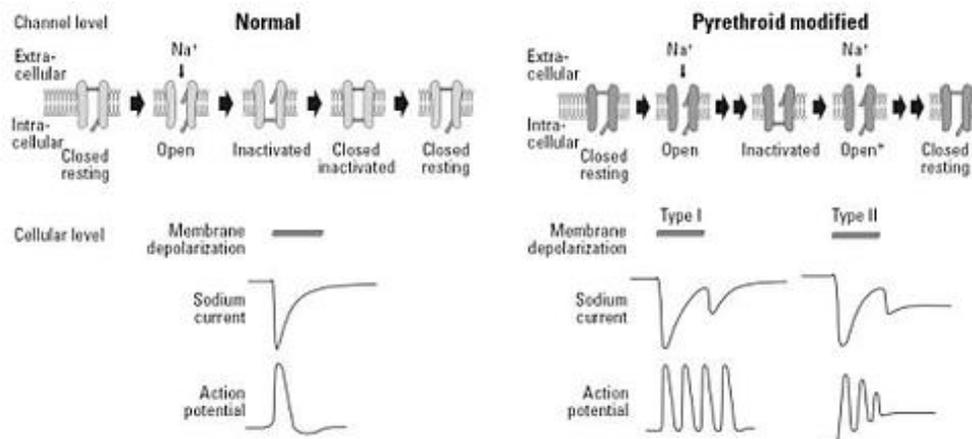
Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

O principal modo de ação dos piretroides consiste na alteração da permeabilidade dos canais de sódio voltagem-dependentes das células nervosas. Os piretroides do tipo I prolongam a abertura do canal de sódio, permitindo o maior influxo de sódio na célula e gerando repetidos potenciais de ação. Os piretroides do tipo II atrasam o fechamento do canal para o estado inativado, provocando inúmeras despolarizações, com amplitudes menores (Figura 4) (SODERLUND *et al.*, 2002; BRADBURY *et al.*, 2008). Isso resulta na despolarização de membrana, descargas repetitivas e perturbações sinápticas que levam aos sintomas de intoxicação por hiperexcitabilidade. Enquanto os piretroides do tipo I promovem repetidos potenciais de ação, os piretroides do tipo II apresentam uma redução gradual na amplitude do potencial de ação, embora nunca retorne ao estado de repouso (NARAHASHI, 1996; SODERLUND ET AL., 2002).

Os piretroides ao nível neuronal possuem ação neurotóxica em insetos e peixes. Em condições normais, após a abertura dos canais de sódio voltagem dependentes e sua consequente despolarização, estes canais ficam inativos e entram em “repouso”. Já sob a ação dos piretroides corre um atraso na inativação desses canais, permitindo assim a entrada contínua de sódio para dentro da célula mesmo após o final da despolarização. Esse processo faz com que o processo de despolarização se torne mais lento, levando a um quadro de paralisia nervosa tanto no sistema nervos central quanto periférico. Em condições normais, a despolarização provoca um único potencial de ação. Em presença de piretroides tipo I, ocorre uma série de potenciais de ação pelo prolongamento da abertura dos canais de sódio, já em presença do piretroides tipo II, ocorre uma maior

despolarização que diminui a amplitude do potencial de ação. (Disponível em: [Poxtiglex23.wix.com/piretroide#!mecanismo/cm8a](http://Poxtiglex23.wix.com/piretroide#!mecanismo/cm8a). Acesso em: 22/12/2015)

**Figura 4:** A ação dos piretroides sobre os canais de sódio. Os piretroides do tipo I levam a uma séria de potenciais de ação, já no caso dos piretroides do tipo II, estes provocam uma menor amplitude do potencial de ação.



Fonte: Adaptado de BRADBURY *et al.*, 2008.

Como mecanismo de ação adicional, NARAHASHI (1991) propôs que piretroides do Tipo II causam a inibição de receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Os piretroides agem sobre o complexo receptor do GABA, ligando-se aos seus receptores, bloqueando os canais de Cl<sup>-</sup> e impedindo sua ativação, sendo o GABA um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados, a ausência de inibição sináptica causa a hiperexcitabilidade do SNC (VALENTINE, 1990; MANNA, 2004; BLOOMQUIST, 2007; CORTELLA, 2010).

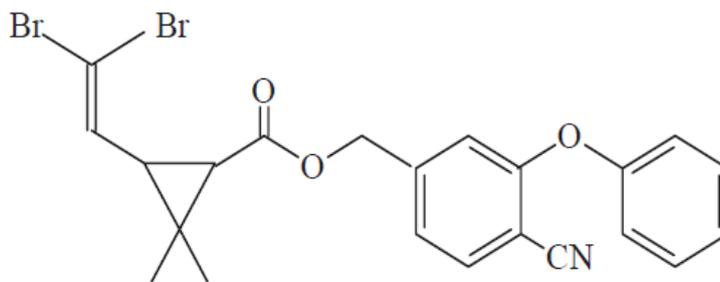
No Brasil os piretroides, como a deltametrina, são amplamente utilizados, sendo seu principal uso em lavouras como agrotóxico, contudo também é usado para o controle de vetores como a dengue e a malária, no combate a ectoparasitas de animais domésticos e aves de corte (KUBITZA & KUBITZA, 1999; CACERES *et al.*, 1981; EL-SAYED *et al.*, 2007; CORTELLA, 2010).

### 2.3 Deltametrina

A deltametrina (Figura 5), piretroide alvo deste estudo, é muito usada nos plantios de algodão, grãos, cereais, frutas e legumes, e para a conservação de

produtos estocados. (GUILOSKI, 2009). Esse composto classificado como medianamente tóxico (Classe III), foi criado em 1974 com a substituição de estruturas das piretrinas por  $\alpha$ -ciano no grupo 3-fenoxibenzil, com o intuito de aumentar sua potência. Sua fórmula molecular é  $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ , um isômero (1R cis;  $\alpha$ S) de oito estereoisômeros ésteres análogos ao dibromo do ácido crisantêmico (SODERLUND *et al*, 2001). A deltametrina é um pó cristalino, sem cor e odor, de densidade  $0,5 \text{ g/cm}^3$  ( $20^\circ\text{C}$ ), massa molecular relativa de 505,24, ponto de fusão variando entre  $98 - 101^\circ\text{C}$ , ponto de ebulição acima de  $300^\circ\text{C}$ , solubilidade em água menor de  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  e solúvel em solvente orgânico (WHO, 1990).

**Figura 5:** Fórmula estrutural da Deltametrina, piretroide Tipo II.



Fonte: Agência Nacional de Vigilância sanitária.

Entre os anos de 1991 e 1995 a deltametrina foi à causadora da morte de peixes da espécie *Anguilla anguilla* no lago Balaton, na Hungria, fato este constatado por resíduos do composto encontrado no fígado e cérebro desses peixes, sendo que foram detectadas alterações nas enzimas hepáticas e inibição da acetilcolinesterase cerebral (BÁLINT *et al.*, 1997). Entretanto, ASSIS e cols (2009) verificaram que a deltametrina não causou inibição da colinesterase muscular em *Ancistrus multispinis*. SAYEED *et al.* (2003) constatou que uma única dose de deltametrina ( $0,75 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) em peixes da espécie *Channa punctatus* expostos por 48 horas, causou indução de vários sistemas antioxidantes no fígado, rim e brânquias, enquanto que a peroxidação lipídica foi induzida em todos os órgãos, principalmente nas brânquias.

Segundo GRAY & OTSBY (1998), a deltametrina pode agir como um desregulador endócrino, que pode interferir no sistema reprodutor de organismos aquáticos. KARNOPP e cols (1999) observaram que o tratamento de *Hordeum vulgare* com deltametrina por 2 horas levaram a uma diminuição na frequência de todas as fases do ciclo mitótico e as anomalias cromossômicas nas células das sementes de cevada. Já BRADBURY e cols (1983) analisaram que doses letais deste composto levaram ao aumento dos níveis de noradrenalina e adrenalina no plasma de ratos, e NICARETA (2004) observou que a exposição a deltametrina inibiu a atividade da enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPASE em órgãos como coração e brânquias em *Ancistrus multispinnis*.

CORTELLA (2010) estimou que a CL50/96h para matrinxã, *B. amazonicus*, é de 2,6 µg.L<sup>-1</sup> na formulação KESHET®. URAL & SAGLAM (2005) estimaram a CL50/96h para *Oncorhynchus mykiss* em 0,69 µg.L<sup>-1</sup>. Para *Cyprinus carpio*, CALTA & URAL (2004) estimaram em 1,65 µg.L<sup>-1</sup>. GOLOW e GODZI (1994) estimaram a CL50/96h para *Oreochromis niloticus* expostos a deltametrina em 14,4 µg.L<sup>-1</sup>. DATTA & KAVIRAJ (2003), trabalhando com *Clarias gariepinus*, estimaram em 0,004 µg.L<sup>-1</sup>. Já BALINT *et al.* (1995) estimaram que a CL50/96 para carpas é de 0,4 à 2,0 µg.L<sup>-1</sup> e a CL50/96 para ratos é de 31 à 139 mg.kg<sup>-1</sup> e de 19 à 34 mg.kg<sup>-1</sup> para camundongos, enquanto que MESTRES & MESTRES (1992) relataram doses letais de deltametrina dissolvida em água por 96 horas de 0,39 µg.L<sup>-1</sup> para *O. mykiss*, 1,84 µg.L<sup>-1</sup> para *C. carpio* e 3,50 µg.L<sup>-1</sup> para *Sarotherodon mossambica*. A partir dos resultados destes estudos, verifica-se que os valores estimados para toxicidade aguda da deltametrina em peixes são da ordem de microgramas. Todavia, a portaria 1.469/2000 do Ministério da Saúde (2001) estabelece o limite máximo de 20 µg.L<sup>-1</sup> para a concentração de permetrina (piretroide Tipo I) em águas, porém não estabelece limites para deltametrina (piretroide tipo II).

A exposição de *C. punctatus* a concentrações subletais de λ-cialotrina resulta em reduções significativas da atividade de acetilcolinesterase (AChE) cerebral, muscular e branquial (KUMAR *et al.*, 2008). Em carpa comum, após exposição à deltametrina, a atividade da AChE de cérebro, coração, músculo branco e fígado não apresenta alterações, porém observa-se ligeira redução da atividade plasmática dessa enzima. Além disso, há diferenças quanto às formas moleculares

da AChE encontradas, indicando que a deltametrina pode alterar essa distribuição mesmo sem alterar sua atividade (SZEGLITES *et al.*, 1995).

REDDY & PHILIP (1994) utilizaram uma concentração subletal de cipermetrina em *C. carpio* machos e verificaram a inibição da acetilcolinesterase (AChE) e ATPase. ANDRADE e cols. (2002) investigaram os possíveis efeitos da exposição de ratas prenhas e em lactação a deltametrina. Os resultados mostraram que a exposição a baixas doses de deltametrina (1, 2, e 4 mg.kg<sup>-1</sup>) induziu súbitas alterações no comportamento reprodutivo e na fisiologia dos filhotes machos, enquanto que as mães não foram afetadas. Além disso, a deltametrina está listada na Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como um desregulador endócrino, podendo assim interferir no sistema reprodutor dos animais, como peixes.

Outras enzimas podem sofrer alterações em suas atividades. Em truta arco-íris (*O. mykiss*) exposta à deltametrina observa-se alterações nas atividades enzimáticas de lactato desidrogenase (LDH) e das transaminases plasmáticas, alanina aminotransferase (ALAT) e aspartato aminotransferase (ASAT), que são indicadores de hepatotoxicidade e de estresse (RAO, 2006a; VELISEK *et al.*, 2007). Da mesma forma, as atividades alteradas das fosfatases ácida (FAC) e alcalina (FALC) indicam mudanças na estrutura do fígado ou danos severos devido à toxicidade do pesticida (ERASLAN, 2007).

Além dos efeitos mencionados, a deltametrina afeta o perfil metabólico dos peixes; em particular o metabolismo energético e antioxidante (KUMAR & GOPAL, 1999; GABBIANELLI *et al.*, 2002). Estudos sobre estresse oxidativo em peixes causado por xenobióticos têm se tornado uma importante ferramenta da toxicologia aquática (LIVINGSTONE, 2001, AVILEZ *et al.*, 2008).

## **2.4 Biomarcadores**

Biomarcador é qualquer resposta biológica a químicos ambientais que venha a ocorrer em um organismo ou em parte dele, alterando seu estado normal (PEAKALL, 1999). Uma classe de organismos muito estudados para obtenção de tal resposta são os peixes, os efeitos de contaminantes em peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos e modificações comportamentais que

levam ao prejuízo do crescimento e reprodução (ADAMS, 1990). Estes são considerados dentre os organismos aquáticos, os mais sensíveis a alterações ambientais e assim como os mamíferos sofrem bioacumulação, são capazes de responder a agentes químicos em baixas concentrações e são capazes de ativar o sistema enzimático do citocromo P450 para biotransformação (TISLER & ZAGORC-KONCAN, 1997; DA SILVA *et al.*, 2003).

Os biomarcadores são importantes para identificar os efeitos causados por xenobióticos em organismos não alvos, sendo que as respostas são de níveis moleculares, celulares e teciduais. Os biomarcadores permitem detectar a contaminação ambiental, avaliar a magnitude dessa contaminação e identificar as espécies ou populações que correm risco dessa contaminação (PIMPÃO, 2006). Os biomarcadores segundo OOST e cols (2003) estão subdivididos em três tipos: biomarcadores de exposição, que basicamente detectam e quantificam a presença do xenobiótico; biomarcadores de efeito que são os parâmetros bioquímicos ou fisiológicos que correspondam a alterações em níveis molecular, celular ou tecidual; e biomarcadores de susceptibilidade que indicam a habilidade inerente ou adquirida por um organismo de responder a exposição a um xenobiótico.

As respostas que ocorrem em nível molecular até órgão/organismo são sensíveis, detectáveis em curto período de tempo (segundos até horas) e se manifestam em baixas concentrações de xenobióticos. As respostas que ocorrem em nível populacional até ecossistema não são muito sensíveis e se manifestam em dias até décadas, embora possuam alta relevância ecológica (SCHLENK *et al.*, 2003; *Apud* MORAES, 2013). Os biomarcadores bioquímicos são as respostas iniciais e indicadores bastante sensíveis de alteração na função celular, neste grupo encontram-se indução ou inibição de proteínas, a quantificação de metabólitos endógenos e as alterações genotóxicas (OOST *et al.*, 2003; SCHLENK *et al.*, 2008). Os biomarcadores fisiológicos são aqueles em nível celular, tecido, órgão e até mesmo organismo, enquanto os biomarcadores histopatológicos são as mudanças histológicas e a ocorrência de patologias que podem mudar significativamente a função dos tecidos e dos órgãos (SCHLENK *et al.*, 2003).

Dentre os biomarcadores bioquímicos para intoxicação aquática mais conhecidos podemos citar os metabólitos intermediários como glicose e lactato, o cortisol e a atividade colinérgica. Eles podem estabelecer o grau de disfunção que o

xenobiótico pode produzir; além disso, os biomarcadores bioquímicos são muito usados em programas de monitoramento já que estes parâmetros são os primeiros a sofrerem alterações (NICARETA, 2004). Nos últimos tempos os biomarcadores fisiológicos e histopatológicos também vem sendo utilizados para documentar e quantificar a exposição e os efeitos dos poluentes no meio ambiente, podendo ser utilizados com biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito (ADAMS, 1990).

Dessa forma a utilização de biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e histopatológicos pode ser uma ferramenta útil para o monitoramento da poluição ambiental nas populações de peixes, organismos de grande importância ecológica e nutricional.

#### **2.4.1 Biomarcadores bioquímicos**

As alterações bioquímicas são as primeiras respostas detectadas e quantificadas frente à variação ambiental, incluindo as alterações no ambiente químico. Estas são geralmente mais sensíveis que outros em níveis mais elevados de organização biológica, portanto são chamados de biomarcadores precoces de contaminação ambiental (PAYNE *et al.*, 1987; STEGEMAN *et al.*, 1992; BUCHELI; FENT, 1995)

Uma alteração fisiológica ou bioquímica ocorre em resposta a um agente estressor, como um xenobiótico, sendo que a alteração pode ser causada, entre outros fatores, por um colapso de uma função físico-química ou na tentativa de manter a homeostase (LANGIANO, 2006). Um organismo pode absorver o xenobiótico por diversas maneiras, inclusive pelas brânquias, sendo então transportado pelo sangue até os órgãos onde será metabolizado. Estes compostos podem interagir com moléculas de DNA, proteínas e lipídios causando efeitos genotóxicos, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, além de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam sérios danos ao DNA (VALAVADINIS *et al.*, 2006).

ERASLAN (2007) ao estudar os efeitos da deltametrina em camundongos observou que os níveis de glicose sanguínea aumentavam na presença de piretroides, pois estes proporcionavam aumento na síntese de adrenocorticóides e glucagon, mas diminuía a síntese de insulina. O mesmo efeito foi observado em *C.*

*carpio* mediante exposição por 72 horas ao lindane e para o *Heteropneustes fossilis* após 96 horas de exposição ao malation; entretanto em ambos os casos houve um aumento dos níveis de glicogênio no músculo e fígado (GLUTH & HANKE, 1985; LAL *et al.* 1986). Segundo AGUIAR e cols (2004), as concentrações de glicogênio hepáticos de matrinxã expostos a 2ppm de Folidol 600 reduziram 80% com relação ao grupo controle. VENTURINI (2015) para pacu exposto por 96 horas a triclorfon observou uma redução significativa nas concentrações de amônia e aumento nas concentrações de aminoácidos livres e glicose no fígado o que também sugere neoglicogênese hepática.

ADHIKARI *et al.* (2004) constataram que peixes expostos a cipermetrina (piretroide semelhante a deltametrina) tiveram redução significativa nos valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. SAYEED *et al.* (2003) verificaram em *Channa punctatus* exposto à 0,75µg/L de deltametrina por 48h, a indução de várias enzimas antioxidantes no fígado, rim e brânquias, além de peroxidação lipídica em todos os órgãos. Entretanto, mesmo com dados mostrando os efeitos negativos dos inseticidas em peixes, não há atualmente no Brasil, limites específicos estipulados para a concentração de deltametrina em águas naturais.

#### **2.4.1.1 Sistema Colinérgico**

O sistema colinérgico é formado pela acetilcolina, seus receptores de membrana e pelo aparato enzimático responsável pela sua síntese e degradação, sendo a acetilcolina o principal neurotransmissor do sistema nervoso central, periférico e das junções neuromusculares (VENTURA *et al.*, 2009).

A síntese de acetilcolina é feita a partir de acetil-coenzima A e colina, reação mediada pela enzima colina-O-acetil-transferase (ChAT). Uma vez sintetizada, a ACh é transportada e armazenada em vesículas sinápticas. Esse processo é realizado por um transportador vesicular de ACh (VAChT), após ser liberada por exocitose a ACh interage com receptores colinérgicos na membrana pré e pós-sináptica. Posteriormente a enzima acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa a ACh, na fenda sináptica, em acetato e colina liberando um próton; processo vital para o funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular (VENTURA *et al.*, 2009; VIANNA, 2005).

As colinesterases são enzimas que hidrolisam ésteres de colina com alta velocidade; em geral os vertebrados, como os peixes, possuem duas colinesterases: a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase. A diferença dessas duas enzimas é baseada na especificidade por substratos e na sensibilidade a inibidores específicos. A AChE tem maior afinidade pela acetilcolina, enquanto a butirilcolinesterase possui maior afinidade pelos substratos mais hidrofóbicos como a butirilcolina (FREITAS, 2009).

A acetilcolinesterase é uma glicoproteína globular encontrada nos neurônios colinérgicos, nas proximidades das sinapses colinérgicas, e em concentrações elevadas nas junções neuromusculares (MASSOULIÉ *et al.*, 1993). Sua função é catalisar rápida e eficientemente a acetilcolina, isso desativa o neurotransmissor após sua ligação ao receptor, o que impede seu acúmulo na fenda sináptica e evita a produção de estímulos contínuos, reestabelecendo a estabilidade da membrana pós-sináptica e a sua permeabilidade por mecanismos de repolarização (ALMEIDA, 2011).

Quando a atividade da AChE é inibida, há o bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, paralisando as funções vitais devido à sobreposição dos impulsos nervosos, causados pela permanência dos canais de sódio abertos (STENESH, 1998 *Apud* COLOMBI, 2009). Estudos feitos com *Cyprinus carpio*, utilizando-se a CL50/96h de diafuran, mostraram significativa inibição da atividade da enzima tanto no cérebro quanto no músculo do animal (GOLOMBIESKI *et al.*, 2008). Tratamentos com deltametrina resultaram em uma queda significativa dos níveis de acetilcolina em cérebro de ratos (ALDRIDGE *et al.*, 1978). HOSSAIN *et al.* (2004), observaram aumentos significativos nos níveis de acetilcolina de ratos, contudo não obtiveram aumentos significativos na atividade da acetilcolinesterase.

#### **2.4.1.2 Carboxilesterase**

As carboxilesterases podem ser utilizadas como biomarcadores de exposição a inseticidas e como componente importante nos programas de monitoramento ambiental; estudos com essas enzimas envolvendo a desintoxicação de organofosforados estão sendo realizados (WOGRAM *et al.*, 2001). Inseticidas como os organofosforados, carbamatos e os piretroides, contêm

um grupamento éster na sua estrutura química e portanto, são suscetíveis à reação de hidrólise (BROGDON & MCALLISTER, 1998).

As esterases são um grupo de enzimas que participam da hidrólise de ésteres, peptídeos, amidas e halogenetos. Elas podem ser classificadas de acordo com seus inibidores em: acetilcolinesterases, quando inibidas pelo malation e sulfato de eserina; arilesterases quando inibidas por Sulfato de Cobre e acetil esterases quando não sofrem ação de inibidores (OAKESHOTT *et al.*, 1993). As carboxilesterases são assim chamadas quando são inibidas apenas pelo malation, e também porque hidrolisam compostos que apresentam ésteres carboxílicos em sua estrutura, como a maioria dos organofosforados, que são ésteres de ácido fosfórico. Essas enzimas, são codificadas por loci gênicos distintos e ocorrem em grande número de formas, além disso estão envolvidas em atividades fisiológicas importantes, incluindo o metabolismo de agroquímicos (WHEELLOCK *et al.*, 2005).

BRADBURY & COATS (1989) e ELLS & RASMUSSEN (1993) revelaram que a deltametrina presente em ambientes aquáticos pode ser neurotóxica e letal para peixes em concentrações 10 a 1000 vezes menores que os valores de letalidade para mamíferos e aves (KÖPRÜCÜ & AYDIN, 2004). Os piretroides são metabolizados por biotransformação através da hidrólise da ligação éster, oxidação (ROBERT & REIGART, 2013) e consequente conjugação com sulfato. Essa hidrólise é catalisada pelas carboxilesterases hepáticas e do plasma, contudo, pesquisadores afirmam que isso não ocorre em peixes, pois eles seriam deficientes em carboxilesterases e isso tornaria a deltametrina, além de tóxica às pragas, tóxica também aos peixes. (HAYA, 1989).

## **2.5 Matrinxã**

O *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) mais conhecido como matrinxã, um teleósteo de água doce da ordem Characiforme e família Bryconidae, possui o corpo alongado de coloração prateada, com as nadadeiras laterais alaranjadas, nadadeira caudal escura e com uma mancha escura na região umeral. Este teleósteo é originário da bacia Amazônica e do Araguaia-Tocantins, durante a piracema, nada contra a corrente dos rios para realizar desovas, que ocorrem entre dezembro e fevereiro.

**Figura 6:** *Brycon amazonicus*, o popular matrinxã, peixe alvo deste estudo.



Fonte: Moraes (2013)

De hábitos onívoros, se alimenta de frutos, flores, sementes e insetos que caem na água, seus dentes são multicuspidados, dispostos em várias fileiras, mas a boca é pequena e podem atingir até 80 cm e pesar até 5 Kg. São peixes de águas claras, frias e ácidas que normalmente vivem junto a troncos e pedras submersos e que toleram altas densidades populacionais apesar de seus alevinos terem hábito canibalista.

O *B. amazonicus* é a segunda espécie mais criada na Região amazônica por apresentar rápido crescimento em cativeiro e alcançar bons preços no mercado (BRANDÃO *et al.*, 2005). Por isso, hoje existe um interesse crescente sobre essa espécie devido a seu grande potencial para piscicultura (CASTAGNOLLI, 1992). Segundo ZANIBONI-FILHO e cols (2006) o *B. amazonicus* tem ótima aceitabilidade no mercado, devido ao agradável sabor da carne, crescimento inicial rápido e de fácil manuseio. Além disso, por ser onívoro com tendência ao consumo de produtos de origem vegetal, sua ração pode ter um baixo custo, todavia a larvicultura apresenta um intenso grau de canibalismo. Desta forma estudos com o objetivo de melhorar o manejo da espécie podem levar o matrinxã a se tornar tão competitivo no mercado como a tilápia (ZANIBONI-FILHO *et al.*, 2006).

Por se adaptar facilmente as condições de cativeiro, o matrinxã está sendo amplamente usado em pisciculturas no estado de São Paulo, apresenta um bom desempenho de crescimento com menor gasto proteico para a sua manutenção energética quando submetido ao exercício aeróbico de longa duração (nado contra

a corrente), o que demonstra que boas práticas de manejo podem aumentar a velocidade de seu crescimento (HACKBARTH & MORAES, 2006; ROJAS; 2007).

Nossos últimos estudos sobre a sensibilidade do matrinxã ao pesticida organofosforado Folidol e ao fenol, o tóxico mais comumente encontrado nas águas do estado de São Paulo indicam que essa espécie é bem sensível e se apresenta como um bom modelo para estudos com xenobiótico (AGUIAR *et al.*, AVILEZ *et al.*, 2004; 2004; HORI *et al.*, 2006; HORI *et al.*, 2008, AVILEZ *et al.*, 2008 e AVILEZ *et al.*, 2012).

### 3 Objetivos

O objetivo central deste estudo foi investigar os biomarcadores bioquímicos em *B. amazonicus* exposto ao Keshet® (deltametrina) em duas condições experimentais: *in vivo* e *in vitro*. Para atingir este objetivo, as seguintes estratégias foram adotadas:

- Avaliação *in vivo* e *in vitro* da atividade da colinesterase muscular e cerebral de *B. amazonicus* exposto a deltametrina;
- Avaliação de metabólitos e de enzimas do metabolismo intermediário (ALAT, ASAT e LDH) em fígado e músculo branco, após 96 horas de exposição à 20, 40 e 60% da CL/50 96h de deltametrina para *B. amazonicus*;
- Avaliação da atividade de carboxilesterase (CbE) em fígado, brânquias e intestino de *B. amazonicus* exposto à 20, 40 e 60% da CL/50 96h de deltametrina por 96 horas;
- Avaliação da atividade das enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase em *B. amazonicus* exposto à 20, 40 e 60% da CL/50 96h de deltametrina por 96 horas.

Os peixes apresentam grande importância ecológica e são constantemente utilizados como bioindicadores de exposição ambiental. O uso inadequado de agrotóxicos, como os piretroides, favorece a introdução desses compostos aos corpos d'água, contaminando assim, os organismos aquáticos. Dessa forma, visto à contaminação de ambientes aquáticos por inseticidas piretroides, os efeitos deletérios provocados por esta ocorrência e a importância da criação de matrinxã (*B. amazonicus*), justifica-se o estudo de biomarcadores bioquímicos em *B. amazonicus* exposto à deltametrina, um piretroide tipo II, após 96 horas de exposição.

## 4 Material e métodos

### 4.1 Experimento “*in vivo*”

Os animais de experimentação foram adquiridos da fazenda “Polletini” Mogi Mirim - SP” através de doação, e permaneceram por um mês em tanques de 2000 L com água aerada, foto período natural e temperatura média de 26 °C para aclimatação. Nesse período, os peixes foram alimentados com ração comercial adequada para a espécie. Após este período, os animais foram transportados para os tanques-teste (250 L), no quais permaneceram por uma semana em aclimatação ao novo ambiente. Vinte e quatro horas antes do início do experimento de exposição subletal, os animais foram privados de alimentação e permaneceram assim até o final do experimento.. Para o experimento de exposição subletal, foram utilizados 72 exemplares de matrinxã com aproximadamente 200g cada, divididos igualmente em 12 tanques (6 peixes por tanque de 250L). A concentração letal para 50% da população (CL50/96h) de deltametrina (Keshet®) para matrinxã é de 2,6 µg L<sup>-1</sup> (MORAES et al., 2013). Este experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos de exposição subletal à deltametrina ( $n=18$  para cada condição experimental) (Figura 7). Três tanques receberam 0,52 µg L<sup>-1</sup> de deltametrina (20% da CL50/96h); três tanques receberam 1,04 µg L<sup>-1</sup> de deltametrina (40% da CL50/96h); três tanques receberam 1,56 µg L<sup>-1</sup> (60% da CL50/96h); e três tanques não receberam o inseticida, sendo denominados controle. O inseticida foi adicionado diretamente na água de ensaio. A exposição foi feita em sistema estático e com aeração constante. Os parâmetros de qualidade da água foram determinados a cada 24 horas. Após o período de exposição, os animais foram pesados, medidos e anestesiados em 500µL de eugenol (1:20 em etanol) por litro de água (INOUE, 2005). Posteriormente, o sangue foi coletado por punção caudal com seringas heparinizadas e os animais foram abatidos por secção medular para a coleta de tecidos (músculo, cérebro, fígado, brânquias e intestino). O sangue foi centrifugado a 13 400 ×  $g$  por 3 minutos para obtenção de plasma. Não houve hemólise. Os tecidos coletados e o plasma foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos a - 80 °C.

**Figura 7:** Esquema do desenho experimental de exposição ambiental de matrinxã ao xenobiótico deltametrina na formulação Keshet® nas concentrações de 20%, 40% e 60% da CL/50 96h.



Fonte: A autora.

#### 4.2 Parâmetros de qualidade de água

Temperatura, pH e teor de oxigênio dissolvido foram determinados eletrometricamente, por meio de oxímetro YSI 55 e pH-metro Orion 710, no próprio tanque. A dureza da água foi determinada segundo APHA (1980); a alcalinidade total (GOLDSTEIN & CLYMO 1969); a concentração de amônia, pelo método modificado de (GENTZKOW & MASEN 1942). Os parâmetros de qualidade de água estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Média dos parâmetros de qualidade da água após 96 horas de exposição à deltametrina.

Variável	Condição			
	Controle	Exposto 20%	Exposto 40%	Exposto 60%
pH	6,9	6,8	6,7	6,6
Alcalinidade (mg de CO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	30	36,9	35,1	35,9
Dureza (mg de CaCO <sub>3</sub> /L)	33,6	36	28,2	30,2
Oxigênio (%)	3,08	2,9	3,22	3,46
Temperatura (°C)	29,8	28,1	28,3	27,7
Amônia (ppm)	0,169	0,357	0,337	0,411

### 4.3 Intermediários Metabólicos

As concentrações de amônia, aminoácidos livres, glicose, glicogênio, lactato e proteína foram determinados em extrato celular. Para tal foram homogeneizados 50mg de fígado e 100mg de músculo branco em 1ml de TCA (Ácido de tricloroacético) 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 foi centrifugado por três minutos a 12.000 rpm e, o sobrenadante era utilizado para as determinações dos intermediários metabólicos. Para as determinações plasmáticas foram utilizados 100µL de plasma em 900 µL de TCA 20% ou o plasma total. Para a determinação das enzimas do metabolismo intermediário, amostras de 50mg de fígado e 100mg de músculo branco foram homogeneizadas em 1ml de tampão de homogeneização, em banho de gelo, utilizando um homogeneizador tipo Ultra-Turrax IKA® T10 Basic. Os homogeneizados foram centrifugados a 4°C duas vezes (600 x g por 3 minutos; 6000 x g por 8 minutos) e o sobrenadante final foi utilizado para as determinações enzimáticas propostas e para a determinação do teor proteico, para posterior cálculo da atividade específica.

#### 4.3.1 Proteína total

O teor de proteína total foi feita pelo método de KRUGER (1994), utilizando o reagente de BRADFORD. Depois de realizada as diluições apropriadas do homogeneizado neutro de cada tecido, 10 µL de amostra foi adicionado aos poços da microplaca e em seguida adicionado 190 µL de Bradford em cada amostra. A microplaca foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro, a leitura óptica era realizada a 620nm contra um padrão de albumina.

#### **4.3.2 Glicose**

Para a determinação das concentrações de glicose foi utilizado o KIT LAB TEST® cuja determinação segue o método enzimático de Glicose oxidase (TRINDER, 1969). Em duplicatas foram pipetados alíquotas de plasma, fígado e músculo branco em uma microplaca e após dez minutos de incubação a 37°C, a leitura óptica foi realizada em 525nm, contra uma curva padrão de glicose.

#### **4.3.3 Lactato**

A quantificação de lactato ocorreu segundo o método de HARROWER & BROWN (1972). Para a determinação foi adicionado aos extratos 20µL de CuSO<sub>4</sub> a 4% e 3,5ml de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação e incubação por cinco minutos a 100°C foram adicionados 80 µL de p-fenilfenol (1,5g de p-fenilfenol em solução aquosa de NaOH 2%). A mistura foi agitada em vórtex e após uma hora, os tubos foram fervidos por 90 segundos e imediatamente resfriados em banho de gelo. A leitura óptica foi realiza em 570nm, contra um padrão de lactato.

#### **4.3.4 Glicogênio**

A extração do glicogênio tecidual foi realizada segundo BIDINOTTO et al. (1997). Esse método consiste na separação alcoólica do glicogênio seguida pela determinação direta de açúcares redutores totais (DUBOIS, 1956). Foram utilizados para as análises 50 mg de fígado e 100 mg de músculo branco. No método da separação alcoólica (BIDINOTTO *et al*, 1997) utilizam-se como reagentes; hidróxido de potássio (KOH 6 N), álcool etílico e sulfato de potássio 10 % (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), enquanto que na determinação de açúcares redutores totais (DUBOIS, 1956) utiliza-se fenol 4,1 % e de ácido sulfúrico concentrado. A leitura óptica foi realizada no espectrofotômetro “Hach DR/2010” em um comprimento de onda de

480 nm, contra um padrão de glicose que continha 100 nmols. O conteúdo de glicogênio foi expresso em  $\mu\text{mols}$  de glicosil-glicose/g de tecido.

#### **4.3.5 Aminoácidos livres**

A determinação de aminoácidos livres nos tecidos foi feita em extrato neutro segundo o método de COPLEY (1941). Dos homogeneizados neutros foram utilizadas alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  para músculo branco, 20  $\mu\text{L}$  para fígado e 20  $\mu\text{L}$  de plasma puro, e adicionado a estes 2mL de ninhidrina 0,1% em propanol. Os tubos então foram vedados e colocados em banho-maria a 40°C por 40 minutos. Após este período a leitura óptica foi feita em 570nm, contra um padrão de glicina 10 mM.

#### **4.3.6 Amônia**

Para determinação de amônia, um volume adequado de extrato ácido (plasma e tecidos) foi transferido para um tubo com água destilada em um volume final de 2mL e adicionado 0,5mL de reativo de Nessler (GENTZKOW & MASEN, 1942). A leitura óptica era feita em 420nm.

#### **4.3.7 Alanina aminotransferase (ALAT)**

A atividade de ALAT foi determinada em fígado e músculo branco segundo o método adaptado de BERGMEYER *et al.* (1978). Essa determinação consiste na transaminação de alanina (500mM) e  $\alpha$ -cetoglutarato (200mM) em tampão Tris (100mM) pH 7,5, com a formação de piruvato e posterior redução a lactato através da LDH exógena (0,1UI) determinando-se a extinção de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  em 340nm.

#### **4.3.8 Aspartato aminotransferase (ASAT)**

A atividade da ASAT foi determinada em fígado e músculo branco, através da reação de transaminação do aspartato (220mM) e  $\alpha$ -cetoglutarato (200mM) em tampão Tris (80mM) pH7,8, com formação de oxaloacetato e posterior redução a malato através de MDH exógena (0,1UI). A extinção de  $\text{NADH}+\text{H}^+$  foi determinada em 340nm (adaptado de BERGMEYER *et al.*, 1978).

#### **4.3.9 Lactato desidrogenase (LDH)**

A atividade enzimática de LDH foi ensaiada nos homogeneizados de músculo branco e fígado, segundo o método de HOCHACHKA *et al.* (1978). A determinação consiste na transformação de piruvato 30mM em lactato, observando a extinção de NADH+H<sup>+</sup> em 340nm.

#### **4.4 Esterases**

Para as determinações enzimáticas da colinesterase e da CbE foram homogeneizadas alíquotas de 50mg de fígado, cérebro, brânquias e intestino, 100mg de músculo branco em 500 µL e 1000 µL de tampão de homogeneização, respectivamente. As amostras foram centrifugadas em homogeneizador tipo Ultra-Turrax IKA® T10 Basic, sob banho de gelo. Posteriormente foram centrifugados a 15.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (enzima) foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas propostas e para a determinação do teor proteico, para posterior cálculo da atividade específica.

##### **4.4.1 Colinesterase**

A atividade colinesterásica foi determinada nos tecidos por método cinético (ELLMAN, 1961) baseado na hidrólise da acetilcolina 3,75mM acompanhada em 412nm. A mistura da reação era composta de tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico 100mM pH 7,5 e ditiobisnitrobenzólico (DTNB) 6,4mM. A atividade da acetilcolinesterase está expressa em unidades (U) por miligrama de proteína. Uma UI foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1µmol de 5-tio-2-nitrobenzoato por minuto. O coeficiente de extinção molar que foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática foi de 16,950/mM.cm. A proteína foi determinada nos sobrenadantes pelo método de KRUGER (1994) e as atividades enzimáticas foram expressas em atividade específica UI (mg de proteína)<sup>-1</sup>.

##### **4.4.2 Carboxilesterase (CbE)**

A atividade da CbE foi determinada cineticamente (modificado de ELLMAN *et al.*, 1961) em fígado, brânquias, músculo branco, cérebro, intestino e plasma. A enzima foi ensaiada através da hidrólise do substrato feniltioacetato (4,5 mM) em 412 nm. A mistura de reação foi composta por tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico (100mM pH 7,5) e ditiobisnitrobenzólico (DTNB) a 6,4mM. Uma UI foi

definida como  $1\mu\text{mol}$  de 5-tio-2-nitrobenzoato formado por minuto. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo foi de  $16,950\text{ (mM.cm)}^{-1}$ .

#### **4.5 Experimento “in vitro” do efeito da deltametrina (Pestanal®)**

##### **4.5.1 Colinesterase muscular e cerebral**

Foi ensaiada a atividade colinesterásica com acetilcolina, em músculo branco e cérebro de *B. amazonicus* juvenis não expostos à deltametrina na formulação analítica. Uma vez estabelecida a atividade enzimática nesses tecidos, essa atividade foi ensaiada na presença de deltametrina na formulação analítica (Pestanal®). Nessa determinação, os homogeneizados dos tecidos foram previamente incubados por 1 hora em  $0,001\text{mM}$  de deltametrina em etanol. O efeito de deltametrina sobre a atividade enzimática foi descontada da ação do solvente através da determinação da atividade colinesterásica na presença de etanol.

A atividade de colinesterase foi ensaiada, em presença de deltametrina pelo método de ELLMAN *et al* (1961). Ambos os tecidos foram homogeneizados em tampão (50% tampão Tris - Fosfato de Sódio  $50\text{mM}$  e 50% glicerina  $\text{pH } 7,0$ ) e centrifugados a  $10000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante foi utilizado para determinações da cinética enzimática. A acetilcolina ( $3,75\text{ mM}$ ) e o inseticida foram pré-incubados com o sobrenadante por 1 minuto antes do ensaio enzimático. Os ensaios foram feitos em triplicatas ( $n=5$ ) para ambos os tratamentos, exposto e controle. Para todas as concentrações de inseticida, um branco de reação foi ensaiado. O branco de reação composto por tampão fosfato de sódio monobásico e dibásico, (DTNB) e  $6,4\text{mM}$ , acetilcolina e inseticida foi utilizado para todas as concentrações ensaiadas. O teor de proteína nos ensaios foi determinado nos sobrenadantes do homogeneizado pelo método de KRUGER (1994) e as atividades enzimáticas foram expressas em atividade específica ( $\text{UI mg de proteína}^{-1}$ ). Uma  $\text{UI} = 1,0\ \mu\text{mol de acetilcolina hidrolisada min}^{-1}$ .

#### **4.6 Estatística**

As variáveis dos diferentes tratamentos (Controle, Exposto 20%, Exposto 40% e Exposto 60% CL50) foram comparadas entre si. Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e então comparados pela análise de variância ANOVA one-way ( $P < 0,05$ ). As médias dos pontos foram comparadas duas a duas através do pós-teste de Turkey ( $P < 0.05$ ) para  $n=18$ .

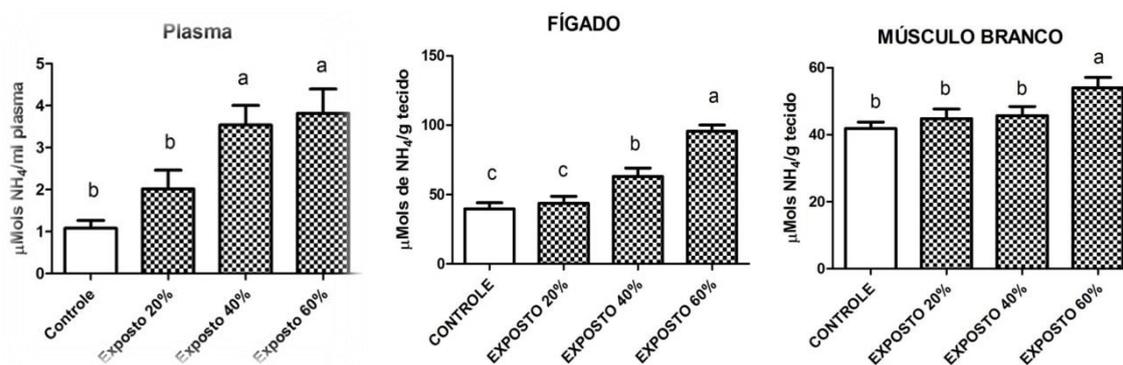
## 5 Resultados

### 5.1 Intermediários Metabólicos

#### 5.1.1 Amônia

Observou-se aumento significativo nas concentrações de amônia plasmática nos grupos de *B. amazonicus* expostos a 40% e 60% da CL50/96h de deltametrina em relação ao grupo controle. A concentração hepática de amônia aumentou 45% e 115% nos grupos expostos a 40% e 60% de deltametrina, respectivamente. No músculo branco a concentração de amônia no grupo de peixes expostos a 60% da CL50/96h de deltametrina aumentou 18% com relação ao grupo controle.

**Figura 8, 9 e 10:** Concentração de amônia no plasma, fígado e músculo branco de *B. amazonicus* exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).

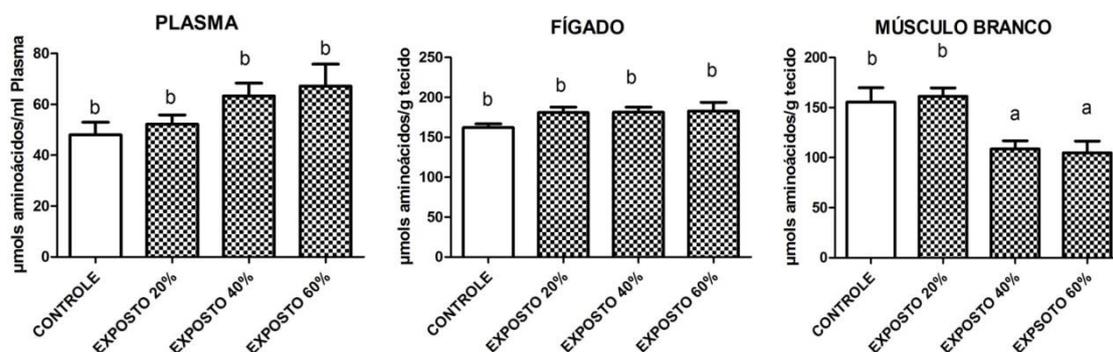


Fonte: Elaborado pela autora.

#### 5.1.2 Aminoácidos

Não foram observadas alterações significativas nas concentrações de aminoácidos livres no plasma nos grupos de *B. amazonicus* expostos a deltametrina em relação ao grupo controle. A concentração hepática de aminoácidos também não apresentou alterações significativas com relação ao grupo controle e nenhum dos grupos avaliados (20%, 40% e 60% da CL50/96H para deltametrina). No músculo branco a concentração de aminoácidos diminuiu significativamente 15% no grupo 40% e 18% no grupo 60% com relação ao grupo controle.

**Figura 11, 12 e 13:** Concentração de aminoácidos no plasma, fígado e músculo branco de *B. amazonicus* exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).

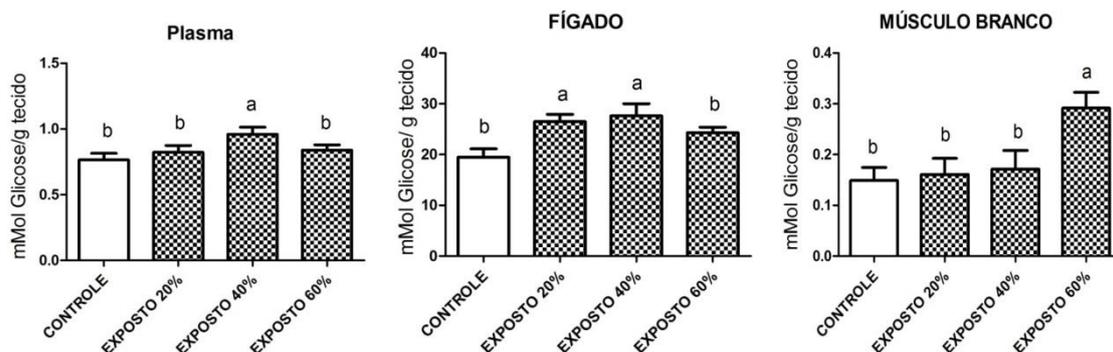


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.1.3 Glicose

Observou-se aumento significativo nas concentrações de glicose plasmática nos grupos de *B. amazonicus* expostos a 40% da CL50/96h de deltametrina em relação ao grupo controle. As concentrações de glicose hepáticas aumentaram 20% e 11% nos grupo 20% e 40% da CL50/96H, respectivamente, com relação ao grupo controle. A concentração de glicose muscular aumentou 42% no grupo exposto a 60% da CL50/96H para deltametrina, com relação ao grupo controle.

**Figura 14, 15 e 16:** Concentração de glicose no plasma, fígado e músculo branco de *B. amazonicus* exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).

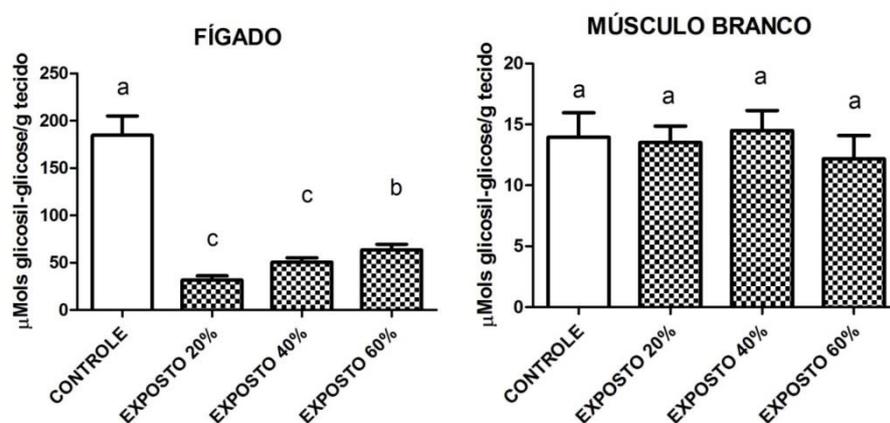


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.1.4 Glicogênio

Foram observadas quedas nas concentrações de glicogênio hepático nos três grupos expostos, sendo que no grupo 20% o nível de glicogênio caiu 71%, no grupo 40% caiu 45% e no grupo 60% caiu 21% com relação ao grupo controle. Porém, não foram observadas alterações significativas nos níveis de glicogênio muscular com relação ao grupo controle.

**Figura 17 e 18:** Concentração de Glicogênio no fígado e músculo branco de *B. amazonicus* exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).

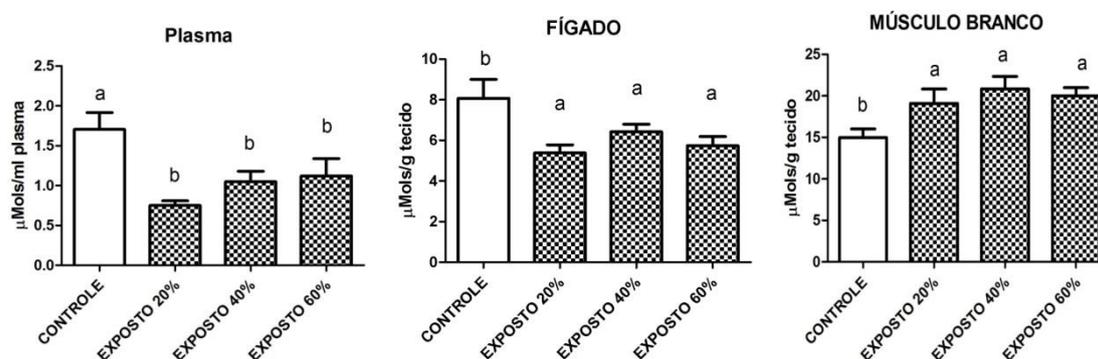


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.1.5 Lactato

As concentrações de lactato plasmáticas diminuíram 30% no grupo exposto à 20%, 7% no grupo exposto a 40% e 13% no grupo exposto a 60% com relação ao grupo controle. Os níveis de lactato hepáticos caíram significativamente com relação ao grupo controle, no grupo 20% houve queda de 29%, no grupo 40% os níveis caíram 8% e no grupo 60% houve queda de 11% com relação ao grupo controle. Foram observados aumento nas concentrações de lactato muscular onde o grupo exposto à 20% apresentou aumento de 8%, o grupo 40% de 20% e o grupo 60% apresentou aumento de 16% com relação ao grupo controle.

**Figura 19, 20 e 21:** Concentração de lactato no plasma, fígado e músculo branco de *B. amazonicus* exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).

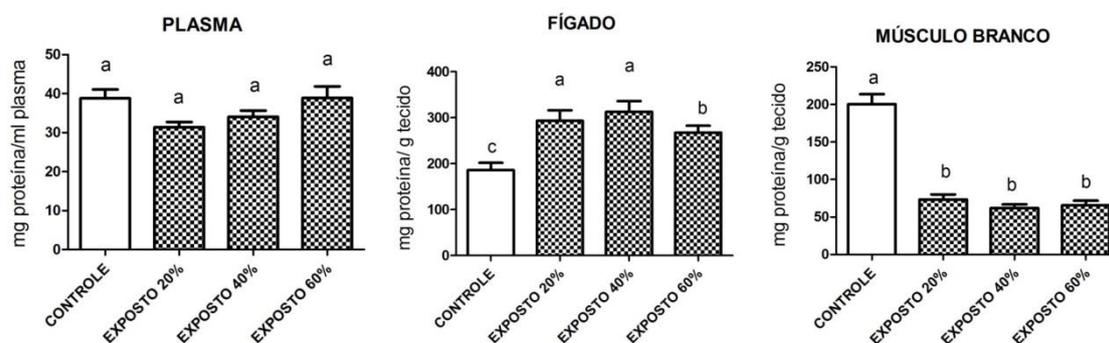


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.1.6 Proteína

Não foram observadas alterações significativas no teor proteico do plasma dos três tratamentos avaliados com relação ao grupo controle. As concentrações de Proteína hepático aumentaram 117% no grupo exposto à 20%, 105% no grupo exposto à 40% e 46,5% no grupo exposto à 60% da CL50/96H com relação ao grupo controle. As concentrações de proteína muscular caíram 55% no grupo exposto à 20%, 61% no grupo exposto à 40% e 61% no grupo exposto à 60% da CL50/96H com relação ao grupo controle.

**Figura 22, 23 e 24:** Concentração de proteína no plasma, fígado e músculo branco de *B. amazonicus* exposto a 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas representam diferenças significativas ( $p < 0,05\%$ ).

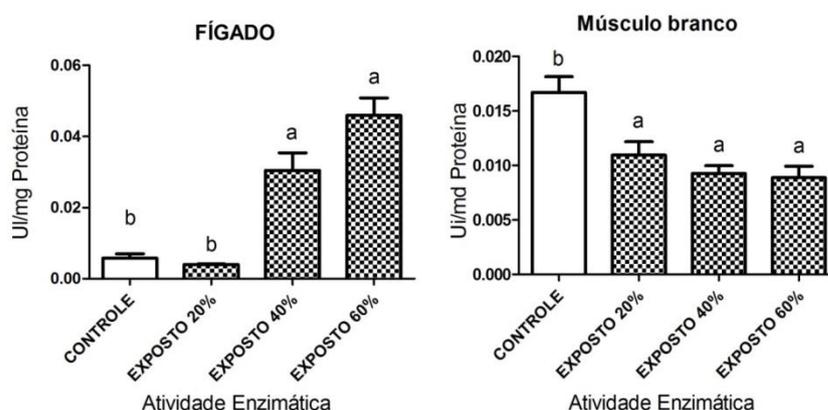


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.1.7 Alanina aminotransferase (ALAT)

A atividade da enzima ALAT/GPT hepática aumentou significativamente 319% no grupo exposto a 40% da CL50/96H e 400% no grupo 60% com relação ao grupo controle, o grupo 20% porém não apresentou alterações significativas. Porém as concentrações de ALT/GPT musculares caíram 25% no grupo 20%, 37% no grupo 40% e 39% no grupo exposto a 60% da CL50/96H de deltametrina para *B. amazonicus*.

**Figura 25 e 26:** Atividade específica da enzima Alanina aminotransferase hepática e muscular de *B. amazonicus* exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).

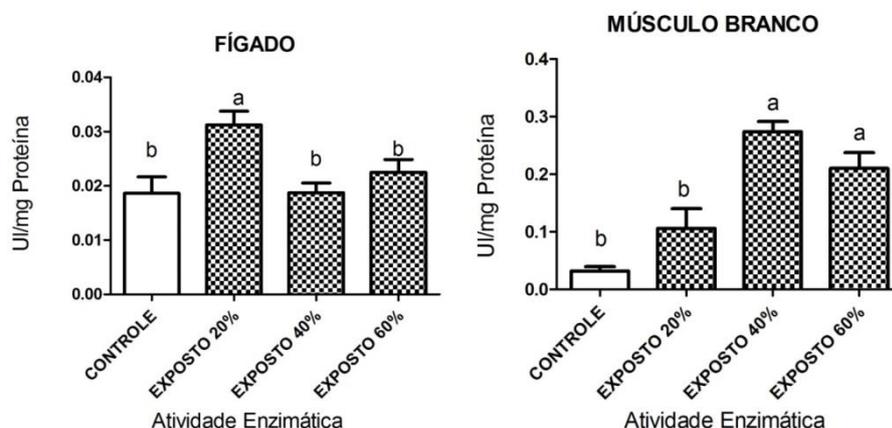


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.1.8 Aspartato aminotransferase (ASAT)

Foi observado aumento significativo na atividade da enzima ASAT/GOT no fígado no grupo exposto a 20% da CL50/96H de deltametrina para *B. amazonicus* com relação ao grupo controle. No músculo branco, foram observados aumentos na atividade enzimática nos grupo 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina para *B. amazonicus*, sendo os aumentos 789% e 600% respectivamente.

**Figura 27 e 28:** Atividade específica da enzima aspartato aminotransferase hepática e muscular de *B. amazonicus* exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).

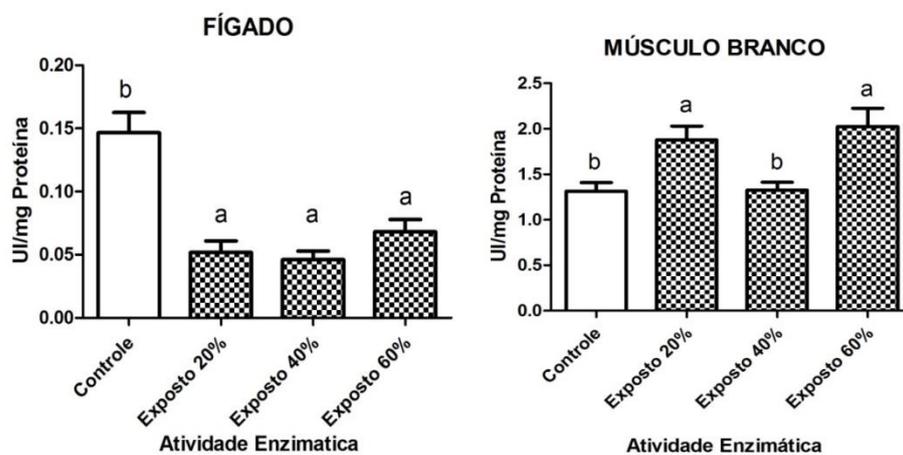


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.1.9 Lactato desidrogenase (LDH)

Foram observadas quedas na atividade enzimática da LDH no fígado nos três grupos exposto a deltametrina, o grupo 20% apresentou queda de 72%, o grupo 40% de 69% e o grupo 60% apresentou queda de 63% na atividade enzimática da LDH quanto comparado ao grupo controle. Com relação a atividade muscular da LDH, foram observados aumento significativos na atividade enzimática no grupo 20% e no grupo exposto a 60% da CL50/96H %, sendo o aumento de 20% e de 28%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle o qual não foi exposto a deltametrina.

**Figura 29 e 30:** Atividade específica da enzima lactato desidrogenase hepática e muscular de *B. amazonicus* exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).



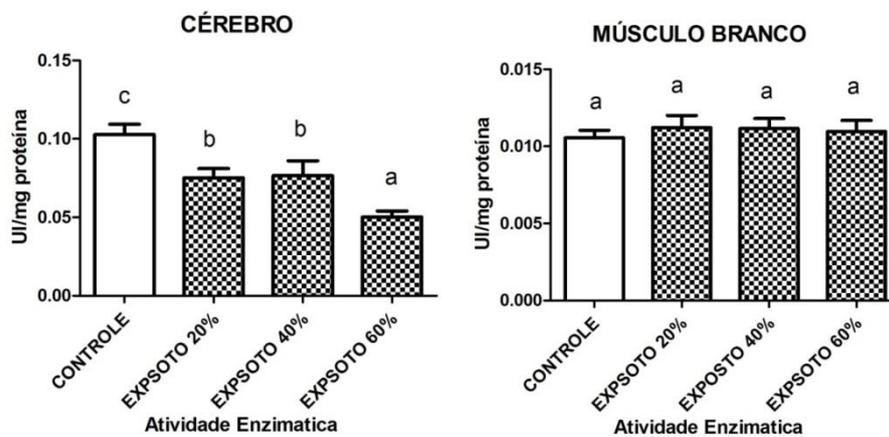
Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.2 Esterases

### 5.2.1 Colinesterase

Foram observadas quedas significativas na atividade cerebral da enzima AChE nos três tratamentos, o grupo 20% apresentou queda de 30% na atividade, o grupo 40% apresentou queda de 28% e o grupo 60% apresentou queda de 53% na atividade da enzima com relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas na atividade enzimática muscular dos três tratamentos avaliados com relação ao grupo controle.

**Figura 31 e 32:** Atividade específica da enzima acetilcolinesterase cerebral e muscular de *B. amazonicus* exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).

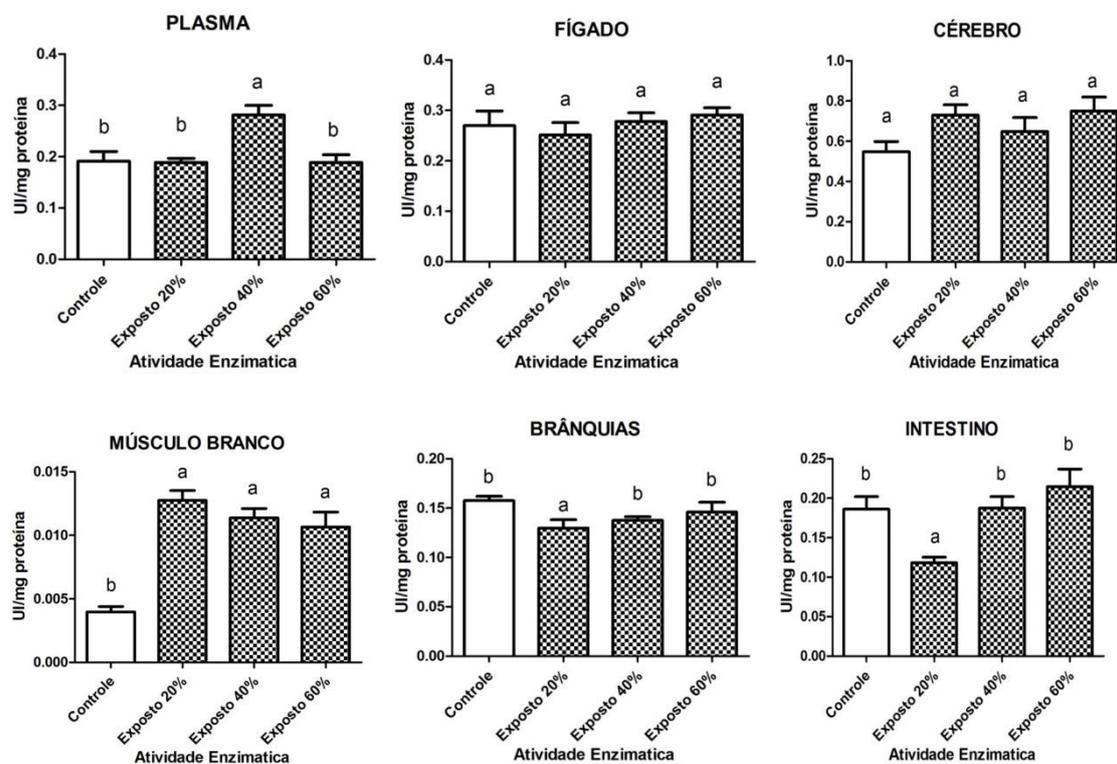


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.2.2 Carboxilesterase

Foi observado aumento significativo na atividade da enzima CbE em plasma de *B. amazonicus* no grupo exposto a 40% da CL50/96H, com relação ao grupo controle. Porém, não foram observadas diferenças significativas na atividade enzimática do fígado e do cérebro de *B. amazonicus* exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H. A atividade enzimática da CbE no músculo branco aumentou significativamente nos três tratamentos avaliados, o grupo 20% apresentou aumento de 221%, o grupo 40% apresentou aumento de 186% e grupo 60% apresentou aumento de 168% na em relação ao grupo controle. A atividade enzimática da CbE nas brânquias e no intestino diminuíram cerca de 24% e 53%, respectivamente, no grupo exposto a 20% da CL50/96H de deltametrina para *B. amazonicus*, com relação ao grupo controle.

**Figura 33, 34, 35, 36, 37 e 38:** Atividade específica da enzima carboxilesterase plasmática, cerebral, hepática, muscular, branquial e intestinal de *B. amazonicus* exposto à 20%, 40% e 60% da CL50/96H de deltametrina. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).



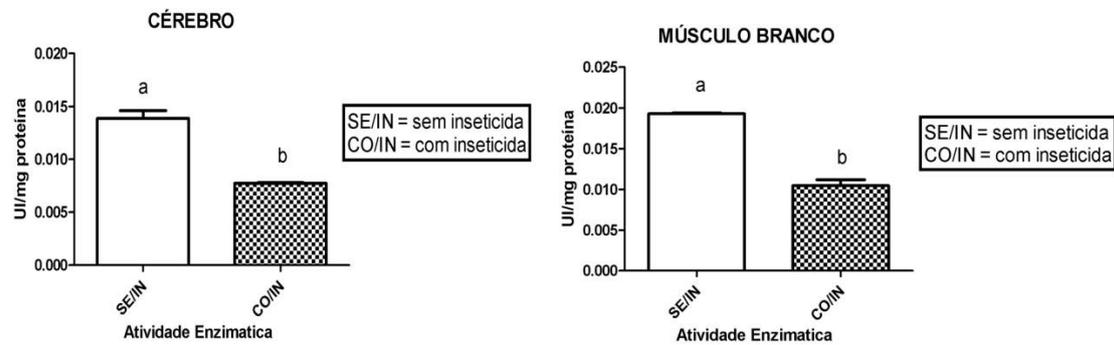
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 5.4 Experimento "in vitro" do efeito da deltametrina (Pestanal®)

##### 5.4.1 Atividade Colinesterásica e ação do Pestanal®

Ao avaliar a atividade da colinesterase *in vitro*, o grupo exposto a deltametrina 0,001mM apresentou inibição da atividade da enzima em cérebro após uma hora de incubação, porém o músculo de *B. amazonicus* não apresentou diferenças significativas na atividade da enzima colinesterase após exposição ao xenobiótico, quando comparado ao grupo controle.

**Figura 39 e 40:** Inibição da atividade específica de acetilcolinesterase cerebral e muscular de *B. amazonicus* por deltametrina 0,001mM. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05\%$ ).



Fonte: Elaborado pela autora.

## 6 Discussão

### 6.1 *Metabolismo*

A exposição de organismos sensíveis, como os peixes, a xenobióticos é capaz de causar alterações no metabolismo intermediário com reflexos no organismo como um todo (SCOTT & SLOMAN, 2004). As causas da intoxicação por piretroides ainda estão sendo estudadas, contudo sabe-se que estão relacionadas ao sistema nervoso e aos mecanismos de metabolização das drogas (COATS, 2008). Outro fato importante é que indivíduos em estágios iniciais de desenvolvimento, tais como alevinos, são mais sensíveis a agentes estressores do que os organismos na fase adulta, o que prejudica o fitness da espécie (DUTTA et al, 1995).

O fígado é um órgão vital nos processos de desintoxicação, e em peixes é considerado o principal responsável pela metabolização e excreção de compostos tóxicos (ROSSI, 2013). O fígado de matrinxã exposto à deltametrina apresentou um aumento inicial nas concentrações de glicose, até a concentração de 40% de piretroide, e uma queda nos níveis de lactato e glicogênio. Este quadro metabólico é sugestivo de glicogenólise hepática associado à gliconeogênese. O aumento hepático do catabolismo de glicose associado ao de glicogênio já foi descrito em outras situações de intoxicação em peixes causadas por xenobióticos. Matrinxã exposto a 2ppm do organofosforado Folidol 600 apresenta um quadro metabólico similar ao observado neste trabalho (AGUIAR et al., 2004), assim como juvenis de salmão do atlântico expostos a piretroides por 70 horas que apresentam glicogenólise hepática (HAYA, 1989). Matrinxã exposto por 96h ao fenol apresenta alterações hepáticas tanto após a exposição quanto à recuperação (AVILEZ 2008). A diminuição das reservas de glicogênio é apontada como um passo regulatório contra a intoxicação por xenobióticos (KAVIRAJ & SAHA 2008). Esse perfil metabólico observado em matrinxã é um indicativo de que os processos de desintoxicação devem ter ocorrido levando a um conseqüente aumento da demanda metabólica.

Os níveis glicêmicos dos peixes expostos a 40% da CL50/96H de deltametrina aumentaram significativamente enquanto as concentrações de lactato plasmático diminuíram em todas as exposições. Apesar de apresentar aumento da glicemia sob a ação de deltametrina, essa observação além de pontual

não foi marcante, podendo-se aceitar muito mais um quadro de irresponsividade glicêmica ao xenobiótico, nas condições experimentais, do que atribuir maior significância a esse ponto isolado. O aumento crônico de glicemia, como seria esperado nestes experimentos, poderia ser atribuído a níveis mais elevados de cortisol resultantes de estresse. A não ocorrência desse fato não descarta a possibilidade de um estresse químico causado pela deltametrina, mas a desintoxicação já discutida deve ter sobrepujado qualquer resposta glicêmica observável oriunda do estresse. Entretanto, respostas glicêmicas típicas de estresse químico podem ser observadas, tal como reportado em tilápia nilótica exposta à deltametrina (EL-SAYED & SAAD, 2007). A hiperglicemia é aceita como um indicador de estresse por poder ser uma consequência da liberação de catecolaminas. Normalmente a hiperglicemia é devida à glicogenólise hepática por ação das catecolaminas o que leva à redução dos teores hepáticos de glicogênio. Entretanto, o quadro glicêmico observado associado à redução da lactemia são muito mais sugestivos de importação de lactato pelo fígado seguida de neoglicogênese hepática.

Como seria esperado, os níveis de glicogênio no músculo branco de matrinxã não apresentaram alteração significativa pela exposição à deltametrina. Esta reserva metabólica em peixes é, em geral, muito estável. As variações nos depósitos de glicogênio muscular dos peixes costumam apresentar decréscimos apenas em situações de exercício extenuante ou de jejum muito prolongado. Porém, os níveis elevados de lactato são sugestivos de fermentação láctica oriunda do estresse causado pela intoxicação. A fermentação láctica observada pode ser interpretada inicialmente como um excesso de atividade muscular, para fuga ou por desconforto, em função do estresse causado pela presença do piretroide. Todavia, independentemente das razões que tenham levado a esse aumento de lactato, esse quadro em si é fortemente sugestivo de anaerobiose muscular. Essa anaerobiose observada pela presença da deltametrina poderia ser devida à ação desse agente químico sobre os mecanismos de respiração aeróbica, impedindo assim seu pleno funcionamento.

Os níveis plasmáticos de proteína ficaram praticamente inalterados durante a exposição à deltametrina, um forte indicativo de que essa situação não agrediu o equilíbrio hídrico de matrinxã, ou que os animais conseguiram manter sua

homeostase hídrica através de mecanismos eficientes de controle nas condições experimentais empregadas. Porém, as concentrações plasmáticas de aminoácido, apesar de não terem sido significativamente alteradas, apresentaram forte tendência de aumento. Esse resultado, associado ao aumento drástico de amônia plasmática é altamente sugestivo de um catabolismo de aminoácidos muito aumentado devido à intoxicação por deltametrina.

Os níveis de proteína hepática aumentaram significativamente já a partir da exposição a 20% de deltametrina. Porém, os teores de aminoácidos livres permaneceram constantes em todos os níveis de intoxicação, o que sugere que esse aumento de proteína hepática tenha sido devido mais a um aumento da síntese *de novo* de proteínas do que à mobilização proteica para os processos catabólicos. Este quadro metabólico não foi, todavia, o mesmo ao longo dos crescentes níveis de intoxicação. O aumento dos teores de deltametrina aumentaram drasticamente os teores de amônia plasmática, o que sugere um aumento significativo do catabolismo proteico. O nível mais alto de intoxicação por deltametrina levou aos valores mais altos de amônia hepática, correspondido pelos níveis plasmáticos, e um princípio de redução dos teores de proteína hepática. Esse perfil corrobora a hipótese de que em níveis altos de deltametrina a síntese de proteínas, provavelmente as envolvidas em processos de desintoxicação, acaba sendo prejudicada pelo catabolismo proteico que ocorre para atender a demanda energética aumentada, tal como sugerido pelo metabolismo de carboidratos acima discutido.

Os teores de proteína da musculatura branca apresentaram drástica redução por ação da deltametrina. Duas possibilidades imediatas advêm desse quadro metabólico; ou ocorreu uma significativa mobilização da proteína muscular no sentido catabólico para atendimento da demanda energética durante a intoxicação ou ocorreu um desbalanceamento hídrico pela agressão do xenobiótico às células musculares levando a um edema ou intumescimento celular. Além disso, há a possibilidade de uma concomitância de ambos os processos. De qualquer forma, a redução de mais de 100mg de proteína por grama de tecido muscular é uma quantidade que equivaleu a mais de 10% da massa muscular úmida e mais de 50% da massa proteica. Considerando-se degradação total de uma proteína-exemplo com PM de aproximadamente 40.000D, sendo ela composta de

aminoácidos com PM por volta de 120D, teríamos a liberação de cerca de 330 mols de aminoácidos. Ora, considerando-se um peixe de 100g em que 15 gramas seriam proteínas, o teor de aminoácidos liberados dessas proteínas, tomando-se por base a proteína-exemplo, seria cerca de 0,37mmols. A redução na concentração de aminoácidos musculares observada nas exposições de 40 e 60% de deltametrina foi da ordem de 0,05mmoles, ou seja cerca de 10% da hidrólise total de proteína muscular. Apenas 20% dessa concentração aparece no aumento de amônia observado na musculatura. E essa excreção em particular só ocorreu na exposição de 60% à deltametrina. Essas diferenças observadas entre redução de proteínas musculares e perfil de aminoácidos e amônia podem ser devidas a alguns fatores; um deles é o fato de ser impossível a reposição do conjunto de proteínas no contexto experimental observado. Com os peixes mantidos em jejum é possível apenas manter o pool muscular de proteínas. Além disso, os valores determinados medem o teor final de proteínas, ou seja, os valores no momento da medida. O mesmo não ocorre com aminoácidos livres e amônia que apresentam uma dinâmica diferente, podendo serem trocados com outros compartimentos tissulares. Assim, a redução de proteínas hepáticas na condição de exposição a 20% pode ser entendida como função da transferência de aminoácidos musculares para síntese de novas proteínas hepáticas. Na condição de exposição a 40% o efeito da deltametrina é mais marcante levando não só à redução da massa proteica, mas à redução do pool muscular de aminoácidos tanto para servir aos processos de síntese hepática de proteínas quanto a satisfazer a própria demanda energética dos processos de desintoxicação. Finalmente, na condição de exposição a 60% a demanda energética deve ter sido drástica ao ponto de aumentar a excreção de amônia e prejudicar os processos de síntese hepática de proteínas reduzindo assim seu conteúdo. A redução do teor de aminoácidos em diferentes tecidos, inclusive muscular, é um efeito já observado por exemplo em *Chana punctatus* e *Clarias batrachus* expostos ao piretroide cipermetrina (KUMAR *et al.*, 2000) e esse fato tem igualmente sido atribuído tanto à síntese de proteínas quanto à demanda metabólica.

As aminotransferases são enzimas essenciais ao metabolismo de aminoácidos. A aspartato aminotransferase pode ser encontrada tanto na forma mitocondrial quanto citoplasmática e aparece em maior concentração no coração,

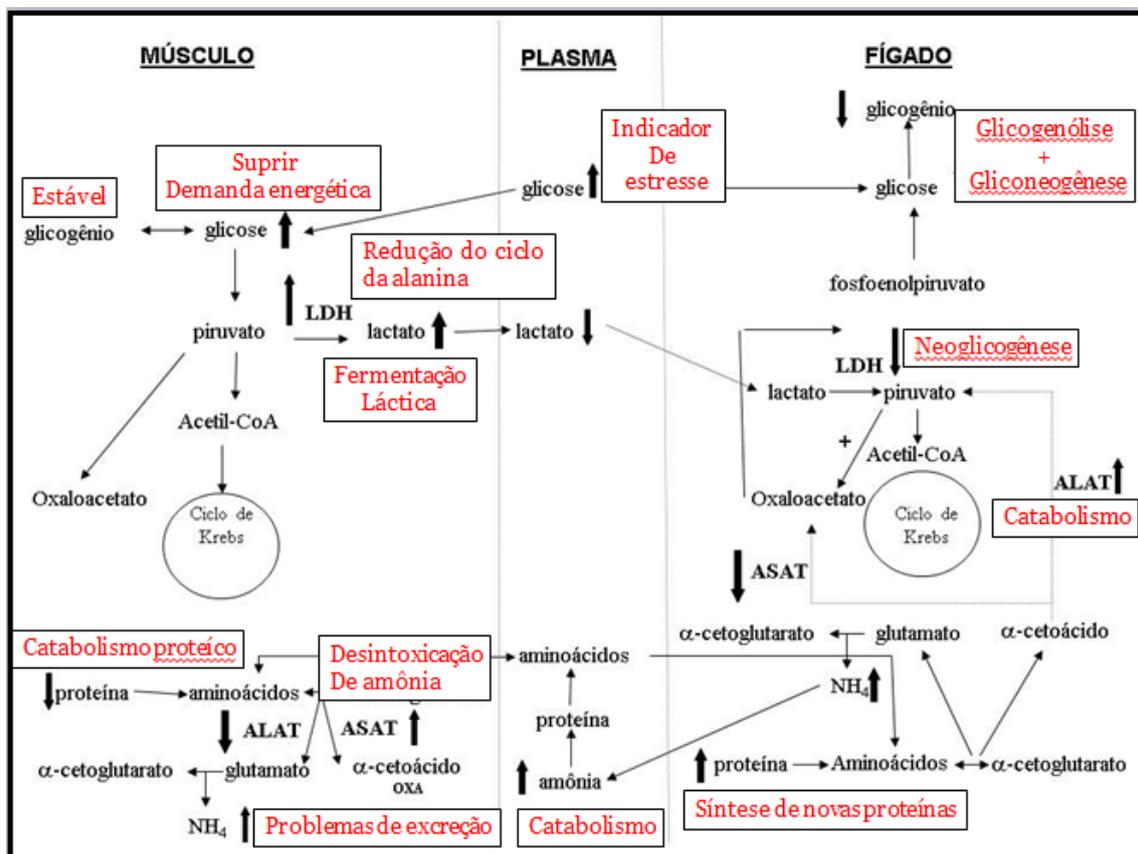
fígado e musculo esquelético. A AST é a enzima responsável pela transferência do grupo amino do aspartato para uma molécula de 2-cetogluturato com formação de oxalacetato e a produção de glutamato. A Alanina aminotransferase é encontrada na forma citoplasmática e aparece em maior concentração no fígado e rim; ela é a enzima responsável pela transferência do grupo amino da alanina para uma molécula de 2-cetogluturato com formação de piruvato e a produção de glutamato.

As atividades de alanina aminotransferase, e aspartato aminotransferase de matrinxã apresentaram alterações significativas após a exposição às diferentes concentrações experimentais de deltametrina. O aumento marcante da atividade hepática de ALT vem corroborar a suposição levantada de grande atividade catabólica de aminoácidos hepáticos seguida de gliconeogênese nas condições de exposição crescente à deltametrina. Essa enzima desempenha papel fundamental na conversão de alanina em piruvato para posterior liberação hepática de glicose. Todavia, a atividade muscular de ALT apresentou redução significativa. Esse fato é um indicativo de que a hipótese de exportação hepática de glicose deve ter tido como alvo outros tecidos periféricos que não o músculo. Como discutido acima, o músculo apresentou atividade láctico fermentativa, o que explicaria a redução da atividade de ALT e conseqüentemente do ciclo da alanina. Reforça essa proposta o aumento da atividade de LDH muscular justificando a preponderância da atividade láctico fermentativa no músculo branco sobre o ciclo da alanina. O perfil de ALT observado no intestino fala a favor da possibilidade de que outros tecidos periféricos devam ter sido os alvos da atividade neoglicogênica do fígado. A atividade de LDH hepática tem papel neoglicogênico a partir de lactato. Todavia, no presente quadro a avaliação de neoglicogênese hepática estaria embasada na interconversão de aminoácidos muito mais que de lactato, justificando assim a redução de atividade da LDH hepática e o aumento da ALT.

A atividade de AST está fundamentalmente associada aos mecanismos de excreção nitrogenada. Apesar de aumento nas concentrações de amônia e possivelmente nas taxas de excreção deste catabólito, a ureia é outro composto responsável pela desintoxicação de amônia nos peixes. Assim, o aumento da AST pode ser reflexo do aumento dessa atividade metabólica em função da demanda energética advinda da intoxicação por deltametrina. Apesar desta atividade ser esperada de forma mais preponderante no fígado, no músculo ela pode contribuir

com as diferentes interconversões de aminoácidos resultantes do catabolismo exacerbado desses compostos, como discutido anteriormente. A ação de xenobióticos não piretroides, tais como organofosforados (OP), levam igualmente a alterações do metabolismo de aminoácidos com reflexos nas atividades de transaminases. Matrinxã exposto por 96 horas a 2 mgL<sup>-1</sup> de metil paration apresenta significativa redução da atividade da ALT hepática (AGUIAR et al, 2004). Tilápias expostas a OP por 30 dias apresentam aumento da atividade da AST e da ALT renal e plasmática e diminuição no fígado e nas brânquias. Entretanto, a recuperação ocorre após sete dias em água livre de xenobióticos (RAO, 2006). A mesma resposta observa-se em *Chana punctatus* sob intoxicação semelhante além da redução da atividade dessas transaminases também em músculo (AGRAHARI & GOPAL, 2009). Entretanto, há relatos de irresponsividade dessas transaminases hepática e muscular, por exemplo, em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao triclorfon (Venturini 2010).

**Figura 41:** Mapa metabólico geral.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 6.2 Esterases

### 6.2.1 Atividade Colinesterásica

Os biomarcadores são ótima ferramenta nos estudos de toxicologia ambiental. Devido sua grande sensibilidade, é possível através deles detectar efeitos tóxicos de contaminantes nos níveis básicos da organização biológica, mesmo que tais contaminantes estejam em baixa concentração ambiental, (STEGEMAN *et al.* 1992). Um biomarcador de exposição muito utilizado é a atividade da acetilcolinesterase visto sua importância na preservação de características do comportamento animal. Animais expostos a xenobióticos, usualmente diminuem sua capacidade de fuga de predadores (SCOTT & SLOMAN, 2004), comportamento esse em que acetil colinesterase desempenha papel fundamental.

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima chave na transmissão do impulso nervoso e é responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), o mediador das sinapses colinérgicas no sistema nervoso, nas junções neuromusculares, nas fibras ganglionares simpáticas e parassimpáticas, nas terminações das fibras nervosas pós ganglionares parassimpáticas e em sinapses do sistema nervoso central, prevenindo passagens contínuas de impulsos, o que é vital para um funcionamento normal do sistema sensorial e neuromuscular (COLOMBI, 2009). Os organofosforados são xenobióticos classicamente conhecidos pela inibição de esterases, particularmente de AChE. Rao (2006b) ao avaliar Tilápias expostas a concentrações subletais de organofosforados, observou inibição crescente da atividade da AChE em cérebro, brânquias e músculo, conforme o tempo de exposição.

No presente trabalho a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral diminuiu nos peixes expostos às três concentrações de deltametrina. Essa inibição da AChE cerebral por deltametrina é um efeito comumente observado após exposição a piretroides (READY *et al.*, 1992; KUMAR *et al.*, 2009). Contudo não foram observadas alterações significativas no músculo branco de matrinxã. REDDY *et al.* (1992) ao estudarem os efeitos da exposição por 48 horas ao fenvalerato em vários tecidos de *Cyprinus carpio* exposto observou um aumento nos níveis de ACh e uma diminuição na atividade da AChE sendo esses níveis na seguinte ordem decrescente: Cérebro, músculo, brânquias e plasma.

HOSSAIN *et al* (2004) mostraram que os níveis de ACh cerebral são dose-dependentes, ou seja, aumentam com a dose de deltametrina, entretanto, não permanecem elevados por muito tempo. Esses autores não verificaram alterações na atividade da AChE, mas observaram aumento na atividade da ChAT, enzima responsável pela síntese de acetilcolina. A atividade de AChE cerebral é inibida e sua expressão gênica é aumentada em híbridos de *Clarias gariepinus* e *Clarias macrocephalus* expostos a organofosforado. Esse aumento da expressão gênica é uma resposta ao aumento da transmissão nervosa colinérgica, exacerbada com a inibição da AChE (SOMNUEK *et al*, 2009).

Não se têm dados sobre o tempo de meia-vida de deltametrina em peixes. ANADON *et al* (1996), relataram rápida absorção em ratos após uma única dose oral de deltametrina, sendo observados no plasma os níveis máximos em 6 horas. No entanto, a meia-vida de eliminação desse xenobiótico é de 38,5 horas. WHO (1990) registrou um tempo de meia-vida de 47,7 dias para deltametrina em água e exposta à luz solar, enquanto VIEIRA *et al* (2007) determinaram um tempo de meia-vida para deltametrina, sem incidência direta dos raios solares e em pH 6,5, de aproximadamente 5 dias. A exposição de *P. anisitsi* e *O. niloticus* ao diazinon e ao carbaril inibe significativamente a atividade da AChE no tecido nervoso (encéfalo) após 2 e 7 dias, sendo mais acentuado o efeito dos contaminantes após 2 dias de exposição. DAS & MUKHERJEE (2003) observaram inibição da AChE cerebral de *L. rohita* mesmo após 45 dias de exposição a cipermetrina. Matrinxã exposto à cipermetrina por 96h, apresenta aumento na atividade da AChE muscular, contudo não altera a atividade da AChE cerebral (MORAES 2013). É provável que a inibição da AChE cerebral leve ao aumento do nível de ACh cerebral, que por sua vez aumenta o estímulo muscular, levando a liberação de mais ACh muscular e ocasionando um aumento na atividade da AChE muscular. Essa resposta não foi observada neste trabalho, visto que houve inibição da AChE cerebral, mas não da AChE muscular. Estes resultados sugerem assim a necessidade de se detalhar este estudo para continuar a avaliação dos efeitos da deltametrina na atividade colinesterásica de peixes e em particular de matrinxã.

### 6.2.2 Carboxilesterase

As carboxilesterase são  $\beta$ -esterases presentes em vários tecidos de vertebrados e invertebrados. E estão relacionadas ao processo de desintoxicação, hidrolisando ésteres carboxílicos e produzindo álcool e ácidos correspondentes (WHEELLOCK et al, 2008). No presente trabalho foram avaliadas a atividade da CbE nos seguintes compartimentos: Plasma, fígado, cérebro, músculo branco, intestino e brânquias.

A taxa de eliminação de um xenobiótico está relacionada a sua toxicidade; quanto menor for a capacidade hidrolítica do organismo em relação ao xenobiótico maior será sua toxicidade (SOGORB & VILANOVA, 2002). As carboxilesterases são responsáveis por reduzir a toxicidade dos piretroides por conseguir transformá-los em derivados menos tóxicos (WHEELLOCK et al. 2004). Contudo, estudos indicam que algumas espécies de peixes são deficientes em esterases tornando-os incapazes de hidrolisar os xenobióticos, o que aumenta a capacidade tóxica desses compostos (HAYA, 1989).

Está descrito que a atividade da enzima CbE é alterada na presença de inseticidas organofosforados e carbamatos. Estudos recentes vêm demonstrando que inseticidas da classe dos piretroides também interferem na atividade da CbE (ZAZERI LEITE et al, 2010). Observamos um aumento da atividade da carboxilesterase em plasma e músculo de matrinxã, sendo que em músculo esse aumento foi de 200% nas três concentrações avaliadas. Contudo não foi observado aumento da atividade da CbE em cérebro e fígado. Em contrapartida as brânquias e o intestino dos animais exposto a 20% da CL50/96H de deltametrina apresentaram queda na atividade enzimática da CbE.

Tilápias adultas expostas ao diazinon apresentam inibição da CbE em brânquias, enquanto que o fígado não apresenta alterações significativas. Isso deve-se ao fato de as brânquias estarem em contato direto com a água contaminada, o que não ocorre com o fígado (DA SILVA, 2012). Cascudos expostos em diferentes intervalos a organofosforados apresentaram inibição da enzima tanto no fígado quanto nas brânquias, enquanto que quando expostos ao carbaril apresentaram inibição da CbE apenas nas brânquias (Rodrigues, 2009), assim como observado no presente estudo. Sabe-se, portanto, que a

carboxilesterase vem sendo relatada como sensível às alterações na condição ambiental (MARGARIDO, 2011).

Supomos que a inibição da CbE nas brânquias e no intestino de matrinxã exposto a 20% da CL50/96h de deltametrina deva-se ao fato de estarem estas estruturas em contato direto com a água contaminada. A redução dessa atividade enzimática apenas em exposição a uma concentração não permite propor explicações prováveis, principalmente por tratar-se da concentração intermediária utilizada no experimento. Contudo não se observou alteração significativa na atividade desta enzima em cérebro e fígado, provavelmente por serem estruturas onde não há contato direto como o xenobiótico. O aumento da atividade de CbE no plasma de matrinxã observado apenas em animais expostos a 40% da CL50:96h de deltametrina constituiu-se em dado isolado cuja significação fisiológica é de difícil interpretação, caso exista de fato.

### **6.3 Experimento “*in vitro*” do efeito da deltametrina (Pestanal®)**

Foi ensaiada a atividade colinesterásica, sobre acetil-tiocolina, em músculo branco e cérebro de matrinxãs juvenis não expostos à deltametrina na formulação analítica. Uma vez estabelecida a atividade específica dessa enzima nesses tecidos, sua atividade foi ensaiada na presença de deltametrina na formulação analítica (Pestanal®). Os organofosforados são classicamente conhecidos como inibidores enzimáticos irreversíveis da atividade de acetil-colinesterase, enquanto os carbamatos agem como inibidores reversíveis do complexo enzima-substrato (DUTTA et al, 1995). Em estudos *in vitro*, BALINT *et al.*, (1995) mostram que a deltametrina causa uma inibição mista na atividade da enzima AChE cerebral de *C. carpio*, devido à interação do piretroide com o centro ativo da enzima modificando seu centro catalítico MORAES (2013) observou inibição “*in vitro*” da AChE cerebral de *B. amazonicus* da ordem de 65% causada pela cipermetrina.

Nossas observações permitem afirmar que a deltametrina, em sua formulação analítica, diminui a atividade de acetil-colinesterase tanto em músculo quanto em cérebro de matrinxã mesmo na concentração de 0,001mM, considerada baixa. Como parcialmente discutido acima a inibição da AChE causa bloqueio da transmissão de impulsos nervosos, paralisando as funções vitais do organismo devido à sobreposição dos impulsos nervosos. Isso leva a alterações

comportamentais e fisiológicas que podem afetar a saúde do animal e até levá-lo à morte (WHELOCK *et al.*, 2005). Além disso, a inibição *in vitro* da AChE mostra a ação direta da deltametrina sobre a molécula de enzima. A compreensão dos mecanismos de ação de organofosforados sobre o sítio ativo de AChE é relativamente ampla atualmente, entretanto, a associação entre piretroides e AChE demanda ainda muitos outros estudos para se saber os tipos e mecanismos de possíveis interações. Esse entendimento abre a perspectiva de estudos sobre moléculas de ação antagônica à ação danosa de piretroides (antagonistas) sobre organismos não alvo. De fato, estudos *in vivo* sobre os efeitos de piretroides mostram seu leque de ação e sua extensão, por exemplo, ao meio ambiente, mas os dados de inibição aqui apresentados asseguram que estudos que detalhem seu nível de ação e intensidade diretamente sobre a molécula de AChE de matrinxã, ou sobre seu sítio ativo, devem ser feitos. Os dados aqui apresentados permitem dizer que a deltametrina sofre alguma interação com a molécula de AChE, quer seja diretamente no sítio ativo da enzima ou em outra região da molécula, e que acaba por afetar a interação enzima-substrato, reduzindo assim a atividade específica desta enzima. Os dados *in vivo* levantam ainda outra hipótese plausível, a de que a deltametrina possa alterar a síntese de AChE por agir diretamente na estrutura gênica ou ainda, e mais provavelmente, sobre os mecanismos de expressão dessa enzima. Entretanto, a alteração da atividade de AChE por efeitos da presença de deltametrina faz desta enzima um potencial biomarcador de efeito para esse xenobiótico em matrinxã.

## 7 Conclusão

Diante dos dados apresentados podemos concluir:

- *B. amazonicus* quando exposto a deltametrina por 96 horas a 20%, 40% e 60% da CL50/96H apresenta alterações no metabolismo intermediário;
- *B. amazonicus* quando exposto a deltametrina por 96 horas a 20%, 40% e 60% da CL50/96H apresenta neoglicogênese hepática;
- *B. amazonicus* quando exposto a deltametrina por 96 horas a 20%, 40% e 60% da CL50/96H apresenta degradação proteica muscular;
- *B. amazonicus* quando exposto a deltametrina por 96 horas a 20%, 40% e 60% da CL50/96H apresenta características fermentativas no músculo;
- *B. amazonicus* quando exposto a deltametrina por 96 horas a 20%, 40% e 60% da CL50/96H tende a produzir energia para a manutenção da homeostasia através do metabolismo intermediário;
- *B. amazonicus* quando exposto a deltametrina por 96 horas a 20%, 40% e 60% da CL50/96H apresenta, como esperado, inibição da atividade da colinesterase cerebral “*in vivo*”;
- *B. amazonicus* quando exposto a deltametrina por 96 horas a 20%, 40% e 60% da CL50/96H apresenta, inibição da atividade da CbE em brânquias e intestino e aumento da atividade da CbE em músculo e plasma, como adaptação a intoxicação pelo xenobiótico;
- *B. amazonicus* quando exposto a deltametrina por 96 horas a 20%, 40% e 60% da CL50/96H apresenta, aumento da atividade das enzimas ALAT e ASAT, e inibição da LDH no fígado na tentativa de suprir a demanda energética animal;
- *B. amazonicus* quando exposto a 0,001mM de deltametrina na formulação analítica (Pestanal®) apresenta inibição da colinesterase cerebral e muscular, demonstrando assim que a colinesterase é um bom biomarcador de efeito para a respectiva droga.

## 8 Referências bibliográficas

AGUIAR, L.H.; MORAES, G.; AVILEZ, I.M.; ALTRAN, A.E.; CORRÊA, C.F. Metabolic effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus* **Environ. Res.** n. 95, p. 224-230, 2004.

AGRAHARI, S.; GOPAL. K. Fluctuations of certain biochemical constituents and markers enzymes as a consequence of monocrotophos toxicity in the edible freshwater fish, *Chana punctatus*. **Pest. Biochem. Physiol.** n. 94, p. 5-9, 2009.

ALMEIDA, L. C.; AGUIAR, L. H.; MORAES, G. Effect of methyl parathion on the muscle and brain acetylcholinesterase activity of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Ciência Rural.** v.35, n.6, p.1412-1416. Santa Maria, 2005.

ALMEIDA, J. R. Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores de Mal de Alzheimer. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas para obtenção de mestre em ciências. Ribeirão Preto, 2011.

ALDRIDGE WN, CLOTHIER B, FORSHAW P, JOHNSON MK, PARKER VH, PRICE RJ, SKILLETE DN, VERSCHOYLE R, STEVENS C. The effect of DDT and the pyrethroids cismethrin and decamethrin on the acetylcholine and cyclic nucleotide content of brain. **Biochem Pharmacol** 1978; 27:1703-6.

AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90, pp. 7915-7922, 1993

ANADON, A. et al. Toxicokinetics of lambdacyhalothrin in rats. **Toxicol. Lett.**, v.165, n.1, p.47-56, 2006.

ANADON, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M. R.; FERNANDEZ-CRUZ, M. L.; DIAZ, M. J.; FERNANDEZ, M. C.; MARTINEZ, M. A. Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-OH-metabolite in the rat. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 141, p. 8-16, 1996.

ANDRADE, A.J.M.; SANTANA, G.M.; ARAÚJO, S.L.; OHI, M.; DALSENTER, P.R. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 36 310-317 2002.

ANDREI, E. (Coord.). **Compêndio de defensivos agrícolas**. 7.ed. São Paulo: Andrei, 2005.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº61, 17 de março de 2003. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=3027&word=deltamethrin>. Acesso em 25/08/2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (para): relatório de atividades de 2011 e de 2012. (3013). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d480f50041ebb7a09db8bd3e2b7e7e4d/Relat%C3%B3rio%2BPARA%2B2011-12%2B-%2B30%2013%201.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 13 de Março de 2014

ASHTON, C. & LEAHY, N. Paraquat. 1989. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim399.htm#PartTitle:14>. Acesso em 12 de Março de 2014.

AVILEZ, I.M.; ALTRAN, A.; AGUIAR, L.; MORAES, G. Hematological responses of the neotropical teleost matrinxã *Brycon cephalus* to environmental nitrite. **Comp. Bioch. Phys.** v. 139C, n. 1-3, 135-139. 2004.

AVILEZ, I.M. Metabolismo antioxidativo, biotransformação hepática e alterações histológicas de matrinxã (*B. amazonicus*) exposto ao fenol. Dissertação de doutorado em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2008.

AVILEZ, I. M.; SOARES, C. A. P.; ROSSI, P. A.; MORAES, F. D.; VENTURINI, F. P.; DE ALMEIDA, L. C.; HACHBARTH, A.; MORAES, G. Deltamethrin increases the acetylcholinesterase activity in brain of matrinxã (*Brycon amazonicus* – Characidae). Anais: Fish Biology congress. Madison. EUA. 2012.

BALINT, T.; SZEGLETES, Z.; SZEGLETES, Zs.; HALASY, K.; NECSOK, J. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorous metidation and the pyrethroid deltamethrin. **Aquat. Toxicol.** v.33, p. 279-295, 1995.

BANERJEE, B. D.; SETH, V.; AHMED, R. S. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Rev Environ Health**; v.16 pag.-40, 2001.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida e micro extração em fase sólida de piretroides em água. **Quim. Nova.** v. 24, p. 172-175, 2001.

CALDAS, L. Q. A. Intoxicações Exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos biperidílicos e piretróides. Centro de Controle de Intoxicações de Niterói, Rio de Janeiro, 2000.

BIDIONOTTO, 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.

BRADBURY, J. E.; FORSHAW, P. J.; GRAY, A. J.; RAY, D. E. The action of mephenesin and other agents on the effects produced by two neurotoxic pyrethroids in the intact and spinal rat. **Neuropharmacology.** v. 22, p. 907-914, 1983.

BRADBURY, S.P., COATS, J.R., Toxicological and toxicodynamics of pyrethroid insecticide in fish. **Environ. Toxicol. Chem**, v. 8, p. 373-386, 1989.

BOLS, N.C. et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental and comparative Immunology**, v. 25, pp. 853-873, 2001.

BROGES, A. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses sub-letais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmen do jundiá *Rhamdia quelen*. Dissertação de doutorado em fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto alegre, 2005.

BUCHELI, T. B.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**, 5: 201-268, 1995

CÁCERES, O. et al. Resíduos de pesticidas clorados em água das cidades de São Carlos e Araraquara. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.33, n.12, p.1622-6, 1981.

CALTA, M., URAL, M., S., Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to young mirror carp, *Cyprinus carpio*. **Environ. Bull.** v.13 (11a) pag.1179–1183, 2004.

CÂMARA DOS DEPUTADOS. Lei nº Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989, Decreto nº 98.816, de 11 de Janeiro de 1990. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1990/decreto-98816-11-janeiro-1990-325361-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em 17 de Março de 2014.

CANTALAMESSA, F. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. **Arch. Toxicol.**, v.67, p.510-513, 1993.

CASTAGNOLLI, N. *Piscicultura de água doce*. 189p. Jaboticabal: FUNEP. 1992.

CHAVES, T.V.S. Estudos das alterações hematológicas bioquímicas e genotóxicas induzidas por agrotóxicos em agricultores do estado do Piauí. Dissertação de doutorado em farmacologia, área de concentração em farmacologia clínica. Universidade Federal do Ceará (UFC). Ceará, 2011.

CLARK, J.M. Effects and mechanisms of action pyrethrin and pyrethroid insecticides. In CHANG, L.W., DRYES, R.S. (Eds.), **Handbook of Neurotoxicology**. Marcel Dekker, Inc., New York, p.511-546, 1995.

CRAWFORD, M. J.; CROUCHER, A; HUTSON, D. H. Metabolism of cis- and trans-cypermethrin in rats. Balance and tissue retention study. **J. Agric. Food Chem.**, v.29, n.1, p.130-135, 1981.

CRESTANI, M. Efeitos do herbicida clomazone sobre parâmetros metabólicos e antioxidantes em jundiá (*Rhamdia quelen*). Dissertação de mestrado em bioquímica toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2004.

COLOMBI, J.S. Avaliação da acetilcolinesterase como biomarcador em experimentos de contaminação in vitro com mehg e hgcl2 em *Hoplias malabaricus* (Block, 1794). Monografia apresentada ao centro de biociências e biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense para obtenção do título de bacharel em Biociências e biotecnologia. 2009.

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

CORTELLA, L.X.R. Estresse oxidativo em matrinxã submetido a deltametrina. Dissertação de mestrado defendida pelo programa de pós graduação em genética e Evolução. 110p. 2010

DA COSTA, G. S. V. Da regulamentação dos agrotóxicos. **Âmbito Jurídico**. XV, n. 103. Rio Grande, ago/2012. Disponível em: <http://www.ambito-juridico.com.br/site/?n link=revista artigos leitura&artigo id=11864>. Acesso em: 13 de Março de 2014.

DA SILVA, D. C. Variações em biomarcadores bioquímicos de contaminação em tilápias do Nilo (*Oreochromus niloticus*) de diferentes portes. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em química, área de química junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e

Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *campus* São José do Rio Preto, 2012.

DAS, B.S.; MUKHERJEE, S.C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** v.134 (1), p. 109-121, 2003.

DATTA, M., KAVIRAJ, A. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to freshwater catfish *Clarias gariepinus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 70 (2), p. 296–299, 2003.

DAVIES, P.E.; COOK, S.J. Catastrophic macroinvertebrate drift and sublethal effects on brown trout, *Salmo trutta* caused by cypermethrin spraying on a tasmanian stream. **Aquat. Toxic.** v.27, p. 201-224, 1993.

DE ALMEIDA, L. C. Determinação da atividade da acetilcolinesterase muscular do teleosteo de água doce, matrinxã, *B. cephalus* (GUNTHER, 1869), submetido ao metil paration (Folidol 600®). Monografia apresentada ao centro de ciências biológicas e saúde para obtenção do título de bacharel em ciências biológicas. Universidade Federal de São Carlos, 2003.

DORES, F. G. C.; FREIRE, M. L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Quim. Nova.** Vol.24, No 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.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K.; ROBERTS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** n. 28, p.350-358, 1956.

ELLS, J. T., RASMUSSEN, J. L., BANDETTINI, P. A., PROPP, J. M. Differences in the neuroexcitatory actions of pyrethroid insecticides and sodium channel specific neurotoxins in rat and trout brain synaptosomes. **Toxic. Appl. Pharmacol.**, v. 123, p.107-119, 1993.

EL-DEMERDASH, F. M. Lambda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants. **Toxicol.** v.21, p.392-397, 2007.

EMBRAPA. Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_40\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html). Acesso em: 13 de Março de 2014.

FREITAS, A. P. Filogenia da sensibilidade da acetilcolinesterase cerebral de peixe ao metil-paraoxon como possível marcador ambiental. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em ciências na área da saúde pública e meio ambiente. Rio de Janeiro, 2009.

ENSIBI, C.; HERNADEZ-MORENO, D.; SANTIYAN, M. P. M.; YAHYA, M. N. D.; RODRIGUEZ, F. S.; PEREZ-LOPEZ, M. Effects of Carbofuran and Deltamethrin on Acetylcholinesterase Activity in Brain and Muscle of the Common Carp. **Rev. Env. Tox.** Janeiro de 2012.

ERASLAN, G.; BILGILI, A.; ESSIZ, D.; AKDOGAN, M.; SAHINDOKUYUCU, F. The effects of deltamethrin on some serum biochemical parameters in mice. **Pest. Biochem. and Physiology.** V.87, p.123-130, 2007.

FURIATTI, R. S.; LÁZZARI, S. M. N. Efeito da aplicação de Pirimicarbe sobre populações de campo de *Myzuz Persicae* (Sulz) (Homoptera: Aphididae) com diferentes níveis de esterases. **An. Soc. Entomol. Brasil** 29(3). p. 739-747, setembro de 2000.

GABBIANELLI, R.; FALCIONI, G.; NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F. Cypermethrin induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. **Toxicology**, Shannon, v. 175, p. 91-101, 2002.

GLUTH, G.; HANKE, W. A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sub lethal concentrations: the dependency on exposure time. *Ecotox. and Environ. Saf.* 9(2):179-188. 1985.

GRAY Jr, L. E.; OTSBY, J. Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non endocrine mechanisms. **Toxicology and Industrial Health**, v.14, n.1/2, p. 159-184, 1998.

GOLOW, A. A.; GODZI, T. A. Acute toxicity of deltamethrin and dieldrin to *Oreochromis niloticus* (Lin). **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, v. 3 (52), 351-354, 1994.

GOLOMBIESKI, J. L.; MARCHESAN, E.; CAMARGO, E. C.; SALBEGO, J.; BAUMART, J. S.; LORO, V. L.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; BALDISSEROTTO, B. Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. **Sci. Agric.** v.65, n.4, p.340-345, July/August 2008.

GUILOSKI, I. C. Estudos in vivo e in vitro dos efeitos de pesticidas em peixes nativos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. 2009

GUPTA, A.; NIGAM, D.; GUPTA, A.; SHUKLA, G. S.; AGARWAL, A. K. Effects of pyrethroids based liquid mosquito repellent inhalation on the blood-brain barrier function and oxidative damage in selected organs of developing rats. **J. Appl. Toxicology**, Chichester, v. 19, p. 67-72, 1999.

HACKBARTH, A.; MORAES, G. Biochemical responses of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) after sustained swimming. **Aquaculture Research**. v. 37, p. 1070-1078, 2006.

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

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

HIEDER, A. F.; HIRSCH-ERNST, K. I.; BAUER, D.; KAHL, G. F.; DESEL, H. Induction of cytochrome P450 2B1 by pyrethroids in primary rat hepatocyte cultures. **Biochem. Pharmacol.** v. 62, p. 71-79, 2001.

HRUBEC, T. C. Effects of temperature on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid Striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **American journal veterinary research**. 58(2): 126-130, 1997.

HOSSAIN, M. M.; SUZUKI, T.; SATO, I.; TAKEWAKI, T.; SUZUKI, K.; KOBAYASHI, H. The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. **Neurotoxicology**. v. 25, p. 825-833. 2004.

HORI, T. S. F.; AVILEZ, I. M.; INOUE, L. K.; MORAES, G. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) juveniles **Comp. Biochem. Physiol.** Part C, v. 143, p. 67-72, 2006.

HORI, T. S. F.; AVILEZ, I. M.; IWAMA, G. K.; JOHNSON, S. C.; MORAES, G.; AFONSO, L. O. Impairment of the stress responses in matrinxã juveniles *Brycon amazonicus* exposed to low concentration of phenol. **Comp. Biochem. Physiol.** Part C, v. 147, n. 4, p. 416-423. 2008.

HUSSAR, G. J. et al. Ensaio para a determinação de dosagem tóxica do fungicida tebuconazole (FOLICUR 200 CE) sobre alevinos e juvenis de tilápia (*Tilapia rendalli*) e de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). v.1, n.1, p.035-044, jan./dez., 2004.

IGNÁCIO, N. F. Seleção de bioindicadores aquáticos pela toxicidade aguda e risco ambiental do inseticida Fipronil. Dissertação apresentada ao Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, *campus* Jaboticabal, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura. Julho, 2014.

IMLAY, J. A., LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity, **Science**, v. 240, pp. 1302-1309, 1988.

KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rats erythrocytes: as possible involvement of reactive oxygen species. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v. 105, p.197-205, 1999.

KARNOPP, L. et al. Efeitos citológicos do inseticida piretróide deltametrina em cevada (*Hordeum vulgare L.*). **Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA**, v.5 no 2, p.131-134. mai-ago,1999.

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

KUBITZA, P.F.; KUBITZA, L.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 3.ed rev., Jundiaí, 1999, 96p.

KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R. S. Cypermethrin induced alterations in nitrogen metabolism in freshwater fishes. **Chemosphere**. v. 83, p. 492-501, 2011.

KUMAR, A.; RAI, D. K.; SHARMA, B.; PANDEY, R. S.  $\lambda$ -cyhalothrin and cypermethrin induced in-vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater

fish, *Channa punctatus* (Bloch). **Pesticide Biochemistry and Physiology** (2008), Doi: 10.1016/j.pestbp.2008.12.005.

LAL, B.; SINGH, A.; SINHA, N. 1986. Biochemical and haematological changes following malathion treatment in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Environ. Poll. A.* 42(2):151-156.

LANGIANO, V. C. Toxicidade do Roundup® e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Dissertação de mestrado em fisiologia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

LASKOWSKI, D. A. Physical and chemical properties of pyrethroids. **Reviews of Environ. Contam. and Toxicology.** 174, 49-170, 2002.

LAVOR, L. M. S. Relação ambiente e sanidade de peixes. Trabalho monográfico do curso de Pós-Graduação “*lato sensu*” em Medicina de Animais selvagens e Exóticos apresentado a UCB como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos. Brasília, 2008.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica.** 4.ed., Guanabara Koogan, RJ, 653p.1969.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, p. 656–666, 2001.

LU, G. D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.** 33: 249-254. 1939.

LUCHESE, G. Agrotóxicos - Construção da legislação. **Biblioteca digital da câmara dos deputados.** Setembro, 2005. Disponível em: <http://www.bd.camera.gov.br>.

MAITI, P. K.; KAR, A.; GUPTA, P.; CHAURASIA, S. S. Loss of membrane integrity and inhibition of type -I iodothyronine 5'-monodeiodinase activity by fenvalerate in female mouse. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 214, p. 905-909, 1995.

MANNA, S. et al. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. **J. Vet. Sci.**, v.7, n.2, p.133-136, 2004.

MARGARIDO, T. C. S. Biomarcadores bioquímicos de contaminação em girinos de anfíbios anuros expostos a Regent®800WG (Fipronil). Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração - Química Ambiental, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", campus São José do Rio Preto, 2011.

MATAQUEIRO, M. I. Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887). **Dissertação** (mestrado em aquicultura). Universidade estadual paulista. Jaboticabal, 2002.

MESTRES, R.; MESTRES, G. Deltamethrin: uses and environmental safety. **Rev. Environ. Contamin. Toxicol.** v. 124, p. 1-18, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle e vigilância da qualidade de água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasil 2001. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/e/cd-cagua/ref/text/48.pdf>

MILHOME, M. A. L.; DE SOUZA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; DO NASCIMENTO, R. F. **Eng Sanit Ambient.** V.14, n.3, p. 363-372. Jul/Set, 2009.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup\_ causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Rev. Chamosphere.** v. 78. p. 294-299, 2010.

MORAGAS, W. M.; SCHENEIDER, M. DE OLIVEIRA. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia** 3(10)26-40, 2003.

MORAES, F. D. Toxicidade aguda e resposta metabólicas e hematológicas do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque, 1818), exposto a concentração subletal de fenol e recuperação. Dissertação de mestrado em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.

MORAES, F. D. Estudos das respostas bioquímicas-fisiológicas e histopatológicas de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Spix; Agassiz, 1829) exposto a cipermetrina (Galgotrin®). Dissertação de doutorado em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2013.

MOSSOULIÉ, J. Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progr. Neurobiol.** v. 41, p. 31-91, 1993.

NARAHASHI, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. **Pharmacol. Toxicol.**, v.79, n.1, p.1-14, 1996.

NARAHASHI, T. Transmitter-activated ion channels as the target of chemical agents. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, 287, p. 61-73, 1991.

NICARETA, L. Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis*. Dissertação de mestrado. Curitiba, 2004.

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

PAYNE, J. F.; FRANCEY, L.; RAHIMTULA, A.; PORTER, E. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, 86: 233-245, 1987.

PANZA, A. B.; CHIMINAZZO, C. C.; FANTINATO, F.M.; OSTI, S.; BERNARDI, M. M.. Avaliação do comportamento de *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposto a deltametrina, um praguicida piretroide. In: VII congresso de Ecologia do Brasil, 2005, Caxambu - MG. avanços nos estudos de ecossistemas terrestres, marinhos e de águas continentais, 2005.

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.

PEAKALL, D. B. The use of biomarkers in hazard assessment. In: **Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe**. 1 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v. 1 (9), p.123-133, 1999.

PERKINS JR., E. J.; SCHLENK, D. In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: role of biotransformation in acute toxicity. **Toxicological sciences**, v. 53, n. 3, p. 308-315, 2000.

PINTO, S. B. Comparação entre as dosagens de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) em presença e na ausência de piridoxal fosfato. Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção do título de farmacêutico da Universidade federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Casa Civil. Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil/03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 12 de Março de 2014.

POLAT, H.; ERKOC, F. U.; VIRAN, R.; KOCAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**. v.49, p. 39-44, 2002.

RAO, J. V. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus* **Comp. Biochem. Physiol.** Part C, n. 143-148, 2006a.

RAO, K. S. P.; RAO, K. V. R. Lipid derivatives in the tissues of the freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* (tilapia Mossambica) (Peters) – effect of methyl parathion. **Proc. Indian Natl. Sci. Acad.**, v. 47B, p. 53-57, 1981.

REDDY, M. M.; PHILIP, G. H.; BASHAMOHIDEEN, M. Regulation of AChE System of Freshwater, *Cyprinus carpio*, Under Fenvalerate Toxicity. **Bull. Env. Cont. Toxicol.** v. 48, p. 18-22. 1992.

REDDY, M. M.; KUMAR, V. A.; REDDY, P. S.; REDDY, S. L. N. Phenol induced metabolic alterations in the brain and muscle of a fresh water fish *Channa punctatus* during sublethal toxicosis. **Ecotoxicol. Environ. Monit.**, n. 3, p. 13-17, 1993.

REDDY, P. M.; PHILIP, G. H. In vivo inhibition of AchE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. **Bull. Env. Cont. Toxicol.** v. 52, p. 619-626, 1994.

RIBEIRO, A. M. Alterações hematológicas e osmorregulatórias em *Prochilodus lineatus* ao chumbo. Monografia apresentada ao curso de ciências biológicas. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007.

RIBEIRO, A. C.; BATISTA, M. T. O.; RODRIGUES, E. D.; DE OLIVEIRA, M. J.; GANNABATHULA, V. S.; RODRIGUES, E.; SUDA, C. N. K. A atividade da lactato desidrogenase e da malato desidrogenase de *Astyanax bimaculatus* (Lambari) da bacia hidrográfica do Rio Uma como biomarcadoras de impacto ambiental. **Rev. Ambient. Água** vol. 10 n. 4 Taubaté – Oct. / Dec. 2015.

RODRIGUES, A. C. F. Estudo de variações bioquímicas e morfológicas induzidas por pesticidas organofosforado e carbamato em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e cascudo (*Pterygoplichthys anisitsi*) como biomarcadores de contaminação

ambiental. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Animal do IBILCE/UNESP como requisito para obtenção de título de mestre em Biologia Animal, área de concentração em Biologia Estrutural. São José do Rio Preto, 2009.

RODRIGUES, L. C. Estudo das glutathione - S - transferases hepáticas solúveis do peixe *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887, Pacu). Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia pelo Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UFRJ para aquisição do título de doutorado. 2003.

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.

SAGLIO, P., TRIJASSE, S. Behavioural responses to atrazine and diuron in goldfish. **Archives of Environ. Contam. and Toxic.** v.35, p.484-491, 1998.

SANCHO, E. et al. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sub-lethal molinate exposure in *Anguilla Anguilla*. **Ecotoxicology environmental safety**, v. 46, p. 81-86, 2000.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUEE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa ounctatus* Bloch. **Ecotox. and Environ. Safety**. v. 56, p. 295-301, 2003.

SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico**. V.73, n.1, p.91-92, São Paulo, jan./jun., 2011.

SCOTT, G. R.; SLOMAN, K. A. The effect of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. **Aquat. Toxicol.** n. 68, p. 369-392, 2004.

SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, 1997. Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>. Acesso em: 17 de Março de 2014.

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). País cresce no mercado de defensivos. (2013). Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News ID=2331>. Acesso em: 17 de Março de 2014.

SILVA DE ASSIS, H. C.; NICARETA, L.; SALVO, L.M.; KLEMZ, C.; TRUPPEL, J.H.; CALEGARI, R. Biochemical Biomarkers of Exposure to Deltamethrin in Freshwater Fish, *Ancistrus multispinis*. Braz. Arch. Biol. Technol. v.52 n.6: pp. 1401-1407, Nov/Dec 2009.

SMIDT, D. O. Os agrotóxicos e seus efeitos no ambiente. Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas. Brasília, 2001.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. **Annu. Rev. Entomol.**, Palo Alto, v. 34, p. 77-96, 1989.

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

STADTMAN, E. R., BERLETT, B. S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. In: D.L. Gilbert and C.A. Colron, Editors, **Reactive Oxygen Species in Biological Systems**, Plenum Press, New York, p. 657-675, 1999.

STENESH, J. Biochemistry. New York, 1998. Apud de: COLOMBI, J. S. Avaliação da acetilcolinesterase como biomarcador em experimentos de contaminação in vitro com mehg e hgcl2 em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794). Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte

Fluminense, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biociências e Biotecnologia. 2009.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R. T.; FORLIN, L.; FOWLER, B. M.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect, In HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. (Eds.), **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 235, 1992.

SZEGLETES, T.; BÁLINT, T.; SZEGLETES, Zs.; NEMCSÓK, J. In vivo effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE. **Ecotoxicol. Environ. Safety.**, v.31, p.258-263, 1995.

SPENCER, C. L. et al. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.298, n.3, p.1067-1082, 2001.

SURESH, A.; SIVARAMAKRISHNA, B.; VICTORIAMMA, P.C.; RADHAKRISHNAIAH, K. Comparative study on the inhibition of acetylcholinesterase activity in the freshwater fish *Cyprinus carpio* by mercury and zinc. **Biochem.** v.26, p.367-375, 1992.

TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. A história da indústria de agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000. In: In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 47. **Anais Sobre 47º Congresso**. Porto Alegre: RS, 2009.

TERRA, F. H. B. PELAEZ, V. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Rev. Economia.** v.36, n.1, 2011.

TIMBRELL, J. A. Biomarkers in toxicology. **Toxicology**, v. 129, pp. 1-12, 1998.

TRAMUJAS, F. F.; FÁVARO, L. F.; PAUKA, L. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Aspectos reprodutivos do peixe-zebra, *Danio rerio*, exposto a doses subletais de deltametrina. **Archives of Veterinary Science**. v. 11, n. 1, p. 48-53, 2006.

URAL, M., S; SAGLAN, N. A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* v.83 pag.124–131, 2005.

VALENTINE, W. M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.20, n.2, p.375-382, 1990.

VENTURA, A. L. M.; ABREU, P. A.; FREITAS, R. C. C.; SATHLER, P. C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Rev Psiq Clín.** v.37(2), p.66-72, 2010.

VENTURINI, F. P. Toxicidade aguda e respostas metabólicas e hematológicas do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposto a concentração sub-letal de triclorfon e recuperação. Dissertação de mestrado em genética e evolução. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2010.

VERSCHOYLE, R. D.; ALDRIDGE, W. N. Structure activity relationships of some pyrethroids in rats. **Arch. Toxicol.**, v.45, p.325-329, 1980.

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

VIJVERBERG, H. P. M.; VAN DER ZALM, J. M.; VAN DEN BERCKEN, J. Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. **Nature**, London, v. 295, p. 601-603, 1982.

VIANA, T. A. P. Bioindicadores de mercúrio em tubarões costeiros pescados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Monografia apresenta à Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, para obtenção do título de bacharel em engenharia ambiental, Rio de Janeiro, 2005.

WHEELOCK, C. E.; KAI, E. J.; WERNER, I.; HUANG, H.; JONES, P. D.; BRAMMELL, B. F.; ELSKUS, A. A.; HAMMOCK, B.D. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. **Rev. Aquat. Toxic.** Volume 74, Issue 2, 30 August 2005, Pages 172–192. 2005.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 97 Deltamethrin. **Geneva:International Programme on Chemical Safety – IPCS**, 1990.

ZANIBONI-FILHO, E.; TATAJE, D. R.; WEINGARTNER, M. Potencialidad Del gênero Brycon en la piscicultura brasileña. **REV. COL. CIENC. PEC.** Vol.19:2, 2006.

ZAZERI LEITE, P.; MARGARIDO, T. C. S.; DE LIMA, D.; ROSSA-FERES, D. C.; DE ALMEIDA, E. A. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, *Hylidae*) as a biomarker for exposure to organophosphate pesticides. **Env. Scie. Polut. Res.** Volume 17, Issue 8, pp 1411-1421. Setembro, 2010.