

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução
Departamento de Genética e Evolução
Laboratório de Bioquímica Adaptativa

ESTRESSE OXIDATIVO EM MATRINXÃ, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE), EXPOSTO AO INSETICIDA PIRETROIDE KESHET®

Aluno: Lucas Ribeiro Xavier Cortella

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

Coorientador: Prof.^a. Dr.^a. Ive Marchioni Avilez

São Carlos
2010

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução
Departamento de Genética e Evolução
Laboratório de Bioquímica Adaptativa

ESTRESSE OXIDATIVO EM MATRINXÃ, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE), EXPOSTO AO INSETICIDA PIRETROIDE KESHET®

Aluno: Lucas Ribeiro Xavier Cortella

Orientador: Gilberto Moraes

Coorientador: Prof.^a. Dr.^a. Ive Marchioni Avilez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração em Genética e Evolução.

São Carlos
2010

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

C827eo

Cortella, Lucas Ribeiro Xavier.

Estresse oxidativo em matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829, Characidae), exposto ao inseticida piretroide Keshet[®] / Lucas Ribeiro Xavier Cortella. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

101 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Toxicologia. 2. Estresse oxidativo. 3. Piretroides. 4. Atividade enzimática. 5. Antioxidantes. 6. Toxicologia aquática. I. Título.

CDD: 615.9 (20^a)

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

**Estresse oxidativo em matrinxã, (*Brycon amazonicus*, SPIX
& AGASSIZ, 1829, CHARACIDAE), exposto ao inseticida
piretróide KESHET®**

Dissertação de Mestrado de Lucas Ribeiro Xavier Cortella

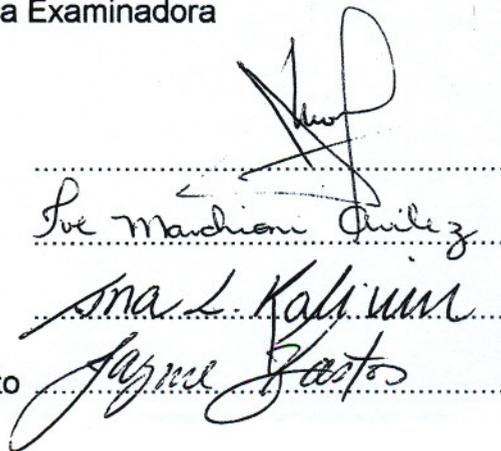
Banca Examinadora

Prof. Dr. Gilberto Moraes

Profa. Dra. Ive Marchioni Avilez

Profa. Dra. Ana Lucia Kalinin

Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto



The image shows four handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal dotted line. The signatures are: 1. A stylized signature for Prof. Dr. Gilberto Moraes. 2. 'Ive Marchioni Avilez' for Profa. Dra. Ive Marchioni Avilez. 3. 'Ana L. Kalinin' for Profa. Dra. Ana Lucia Kalinin. 4. 'Jayme Bastos' for Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

Resumo

O uso de pesticidas, incluindo os inseticidas, herbicidas e fungicidas, pode representar um grande risco aos ecossistemas e uma ameaça potencial à saúde humana, animal e vegetal. Dentre os inseticidas piretróides comercialmente relevantes destacam-se aqueles cujo princípio ativo é a deltametrina. Esta é conhecida como sendo um piretróide (tipo II) tóxico para peixes e outros animais aquáticos, e por possuir um amplo espectro de ações nesses organismos não alvos, incluindo a indução de estresse oxidativo. O estudo do estresse oxidativo em peixes induzido por deltametrina, pode fornecer informações úteis acerca das conseqüências ecotoxicológicas do uso de inseticidas piretróides formulados a base de deltametrina. Para a realização do nosso estudo, utilizamos juvenis de *Brycon amazonicus* como modelo de estudo acerca dos efeitos toxicológicos da deltametrina quando presente na água, e enfatizamos os mecanismos de defesa antioxidante da espécie. Nossos objetivos foram: 1) determinar a $CL_{(1)50; 96h}$ da deltametrina (na formulação comercial Keshet[®]) para *B. amazonicus*; 2) avaliar efeitos tóxicos da deltametrina no metabolismo antioxidante de *B. amazonicus* frente à exposição hídrica a 10% da $CL_{(1)50; 96h}$ e 3) determinar a capacidade de recuperação dos juvenis de *B. amazonicus* após um período de 10 e 20 dias de pós-exposição à deltametrina.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema simplificado do mecanismo de ação do citocromo P450.....	20
FIGURA 2 - Vias do metabolismo da deltametrina em mamíferos.....	22
FIGURA 3 - Glutaciona-S-transferase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	49
FIGURA 4 - Glutaciona-S-Transferase branquial (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	50
FIGURA 5 - Glutaciona-S-Transferase renal (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	51
FIGURA 6 - Glutaciona-S-Transferase plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	52
FIGURA 7 - Superóxido dismutase hepática (U/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	53
FIGURA 8 - Catalase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	54
FIGURA 9 - Catalase branquial (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	55
FIGURA 10 - Catalase renal (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	56
FIGURA 11 - . Glutaciona peroxidase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	57
FIGURA 12 - Glutaciona peroxidase branquial (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	58
FIGURA 13 - Glutaciona peroxidase renal (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	59
FIGURA 14 - Glicose-6-fosfato desidrogenase hepática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	60
FIGURA 15 - Glicose-6-fosfato desidrogenase branquial (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	61

FIGURA 16 - Glicose-6-fosfato desidrogenase renal (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	62
FIGURA 17 - Alanina aminotransferase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	63
FIGURA 18 - Alanina aminotransferase plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	64
FIGURA 19 - Aspartato aminotransferase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	65
FIGURA 20 - Aspartato aminotransferase plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	66
FIGURA 21 - Fosfatase alcalina hepática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	67
FIGURA 22 - Fosfatase alcalina plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	68
FIGURA 23 - Fosfatase ácida hepática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	69
FIGURA 24 - Fosfatase ácida plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	70
FIGURA 25 - Ácido ascórbico hepático (umol/ mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	71
FIGURA 26 - Ácido ascórbico renal (umol/ mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	72
FIGURA 27 - Glutationa reduzida hepática (umol/ mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	73
FIGURA 28 - Glutationa reduzida branquial (umol/ mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	74
FIGURA 29 - Glutationa reduzida renal (umol/ mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.....	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Considerações gerais – Pesticidas.....	8
1.2 Inseticidas Piretróides.....	11
1.3 Deltametrina.....	14
1.4 Biotransformação.....	18
1.5 Espécies Reativas de Oxigênio.....	22
1.6 Sistema de defesa antioxidante e estresse oxidativo.....	25
1.7 Matrinxã.....	30
1.8 Inseticida piretróide KESHET®.....	31
2. OBJETIVOS.....	32
3. METODOLOGIA.....	32
3.1 Determinação da toxicidade aguda CL ₍₁₎ 50;96h da deltametrina (Keshet®) em juvenis de matrinxã.....	33
3.2 Exposição subletal de juvenis de matrinxã a 10% CL ₍₁₎ 50;96h de deltametrina (Keshet®).....	34
3.3 Recuperação da exposição a deltametrina por 10 e 20 dias.....	34
3.4 Determinação dos parâmetros de qualidade da água.....	35
3.4.1 Oxigênio, temperatura condutividade e pH.....	35
3.4.2 Dureza.....	35
3.4.3 Alcalinidade.....	35
3.4.4 Amônia.....	36
3.4.5 Nitrito.....	36
3.5 Quantificação de proteínas totais nos homogeneizados de tecidos.....	36
3.6 Determinações enzimáticas – Enzimas antioxidantes.....	37
3.6.1 Ensaio da atividade da SOD.....	37
3.6.2 Ensaio da atividade da CAT.....	38
3.6.3 Ensaio de atividade da GPx.....	38
3.6.4 Ensaio de atividade da G6PDH.....	39
3.6.5 Ensaio de atividade da GST.....	39
3.7 Determinações enzimáticas – Transaminases e Fosfatases.....	40

3.7.1 Ensaio de atividade da ALAT.....	40
3.7.2 Ensaio de atividade da ASAT.....	40
3.7.3 Ensaio de atividade da FAC.....	41
3.7.4 Ensaio de atividade da FALC.....	41
3.8 Determinações de antioxidantes não enzimáticos.....	42
3.8.1 Quantificação de ácido ascórbico.....	42
3.8.2 Quantificação de glutathiona reduzida.....	42
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5. RESULTADOS I	
5.1 Experimento de determinação da toxicidade aguda $CL_{(1)50;96h}$ da deltametrina (Keshet [®]) em juvenis de matrinxã.....	43
6. DISCUSSÃO I	
6.1 Determinação da toxicidade aguda $CL_{(1)50;96h}$ da deltametrina em juvenis de matrinxã.....	44
7. RESULTADOS II.....	47
7.1 Experimento de exposição subletal de juvenis de matrinxã a 0,26 µg/L de deltametrina (Keshet [®]).....	47
7.1.1 Determinações enzimáticas – Enzimas antioxidantes.....	47
7.1.2 Determinações enzimáticas – Transaminases.....	61
7.1.3 Determinações enzimáticas – Fosfatases.....	65
7.1.4 Quantificação de antioxidantes não enzimáticos.....	69
8. DISCUSSÃO II.....	74
8.1 Experimento de exposição subletal de juvenis de matrinxã a 0,26 µg/L de deltametrina (Keshet [®]).....	74
8.1.1 Sistema de defesa antioxidante e estresse oxidativo.....	74
8.1.2 Enzimas antioxidantes.....	76
8.1.3 Antioxidantes não enzimáticos.....	80
8.1.4 Enzimas transaminases e fosfatases.....	81
8.1.5 Considerações finais.....	83
9. CONCLUSÃO.....	84
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais - Pesticidas

O consumo mundial de pesticidas vem aumentando gradativamente nos últimos anos. Dados publicados em 1997 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos revelaram um consumo que ultrapassava 2,6 milhões de toneladas de pesticidas. Deste total, 85% correspondia ao volume de pesticidas empregado na agricultura (ASPELIN, 1997). Embora a maior parte deste volume seja utilizada na agricultura de países desenvolvidos, o emprego de pesticidas de uso agrícola e doméstico vem aumentando rapidamente também nos países em desenvolvimento [INSTITUTO MUNDIAL DE PESQUISAS (IMP, 1998)]. No âmbito da América Latina, há nove anos atrás, o Brasil despontava como o maior consumidor de agrotóxicos, com um consumo médio anual estimado em 50% da quantidade total comercializada nesta região (OLIVEIRA-SILVA, 2001). O consumo brasileiro continuou aumentando, e recentemente em nota oficial publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, registrou-se um aumento significativo de vendas de agrotóxicos no Brasil. Atualmente, o mercado brasileiro representa cerca de 84% do mercado de agrotóxicos da América Latina (ANVISA, 2008).

Dados registrados pelo Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) e pela Associação Nacional das Empresas de Defensivos Agrícolas (ANDEF) referentes ao período de 1999 a 2007 revelam que de fato, o consumo de agrotóxicos no Brasil aumentou no período considerado. Segundo estes dados, houve um aumento de 4,67% no consumo de pesticidas, sendo que a região sudeste quando analisada em separado das outras regiões do país, apresentou um aumento de consumo estimado em 4,93% neste período. Ainda segundo estes órgãos, as vendas totais de agrotóxicos no Brasil, em 2007, ultrapassaram a marca de 5 bilhões de dólares. Esse valor corresponde a aproximadamente 700 milhões de toneladas de agrotóxicos aplicados nos mais diversos cultivos da agricultura brasileira. Atualmente estão registrados e autorizados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, mais de 1.200 produtos comerciais formulados e cerca de 450 ingredientes ativos, para as mais diversas aplicações. De um modo geral, dentre os pesticidas, aqueles de ação herbicida são os mais consumidos, seguidos pelos inseticidas e fungicidas (ANVISA, 2008).

O crescimento do uso de pesticidas vem causando danos sérios ao meio ambiente. Isso porque parte do material aplicado pode incorporar-se ao solo, e outra parte pode ser transportada para os rios pelas chuvas, podendo assim atingir os organismos aquáticos. Por isso os efeitos decorrentes do uso indiscriminado de agrotóxicos somado ao manejo inadequado dos mesmos constituem um problema ambiental reconhecido mundialmente (TSUDA et al., 1995; WILSON & TISDELL, 2001). O uso excessivo e irregular de pesticidas na agricultura afeta agricultores, consumidores dos produtos agrícolas, frutos e vegetais, as fontes hídricas e como consequência o ecossistema como um todo (SANTOS, 1996; WILSON & TISDELL, 2001).

Os pesticidas podem atingir o solo e as águas por meio das mais variadas atividades: 1) na aplicação em campo para controle de ervas daninhas; 2) na lavagem das folhas previamente tratadas; 3) na aplicação direta em águas para controle químico de vetores de doenças; 4) na aplicação direta em águas para controle químico de parasitas de peixes; 5) no manejo, no tratamento e no descarte inadequados das embalagens vazias; 6) nas lavagens de equipamentos de aplicação; e 7) a partir de efluentes não tratados das indústrias de agrotóxicos [INSTITUTO MUNDIAL DE PESQUISAS (WRI, 1996)].

Segundo DORES e FREIRE (2001) a preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por pesticidas tem crescido no meio científico. Estudos desenvolvidos em varias regiões do mundo têm revelado que a porcentagem de resíduos dos pesticidas empregados na agricultura que atinge os ambientes aquáticos é geralmente baixa. Contudo, ainda segundo os autores, outros estudos apontaram que pesticidas persistentes e com grande mobilidade no ambiente têm sido detectados em águas superficiais e subterrâneas.

A baixa concentração da maioria dos pesticidas em água é em parte, devido ao fato dos mesmos serem geralmente pouco solúveis em água e também devido ao efeito de diluição (HIGASHI, 1991). No entanto, isto não exclui a possibilidade de que concentrações muito altas venham a ocorrer depois de algumas chuvas, principalmente quando áreas de cultivo localizadas ao redor de rios ou córregos tenham sido recentemente tratadas com altas doses de pesticidas. Ainda, mesmo em baixas concentrações os pesticidas representam riscos para diversas espécies de organismos aquáticos, como pequenos invertebrados e os peixes (DORES & FREIRE, 2001).

Alguns estudos publicados sintetizam os fatores que influenciam a dinâmica dos pesticidas no ambiente e revelam que é grande o grau de dificuldade na avaliação de riscos de contaminação de ambientes aquáticos decorrente do uso dessas substâncias, dada a grande quantidade de processos envolvidos nesta dinâmica (AHARONSON, 1987; WAUCHOPE, 1992; BARCELO, 1997).

Frente a este complexo cenário a legislação mundial vigente estabelece alguns limites para a presença de pesticidas em águas destinadas ao consumo. A Comunidade Econômica Européia estabeleceu em 0,1 µg/L, a concentração máxima admissível de qualquer pesticida em águas destinadas ao consumo (DORES & FREIRE, 2001). Contudo, tal limite é passível de questionamentos, uma vez que não leva em conta a toxicidade específica de cada produto, e devido ao fato de as metodologias analíticas disponíveis para alguns compostos não atingirem limites de detecção desta ordem de grandeza. Por outro lado a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos-US EPA e a Organização Mundial da Saúde – OMS estabelecem níveis máximos específicos, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos, para diferentes categorias de pesticidas.

Segundo RODRIGUES (2003) a contaminação de ecossistemas aquáticos por pesticidas e a conseqüente intoxicação dos peixes podem ocorrer de forma aguda ou crônica. Em geral, a intoxicação aguda resulta em mortalidade dos peixes. No entanto, ainda segundo o autor, a poluição é muitas vezes um processo crônico, aparentemente sem danos visíveis, podendo resultar em vários efeitos subletais de curto e longo prazo.

Organismos aquáticos quando expostos a concentrações, ainda que muito baixas de inseticidas, sofrem alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas em tecidos vitais, como por exemplo, brânquias, fígado e rim. Acerca disto muitos estudos têm sido realizados com respeito aos efeitos subletais da intoxicação de peixes por inseticidas. Dentre os inseticidas, a classe dos organofosforados e a classe dos piretróides são as que vêm sendo investigadas com mais frequência em tais estudos (IWANA & NAKANISHI, 1996; SARAVANA-BHAVAN & GERALDINE, 2000).

1.2 Inseticidas piretróides

Os inseticidas englobam compostos quimicamente muito diferenciados, que podem ser agrupados em quatro categorias principais: organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001).

As piretrinas são substâncias naturais que apresentam ação inseticida e que podem ser obtidas a partir do extrato de flores de plantas do gênero *Chrysanthemum sp.* O piretro é um inseticida natural, instável na luz e no ar, e isso limita sua efetividade na proteção de lavouras e no controle de insetos vetores. Em vista disto, compostos piretróides sintéticos vêm sendo desenvolvidos e comercializados em escala industrial (VELISEK et al., 2006). Tais compostos sintéticos apresentam maior estabilidade na luz e no ar, possuem uma potente e rápida atividade inseticida e são relativamente menos tóxicos aos mamíferos, quando comparados com outras classes de inseticidas (SODERLUND et al., 2002).

Inicialmente muitos piretróides sintéticos foram desenvolvidos e comercializados com relativo sucesso, apresentando ação inseticida contra insetos domésticos. Posteriormente outros inseticidas a base de piretróides foram desenvolvidos e amplamente comercializados para o emprego no combate as mais diversas pragas da agricultura (CASIDA et al., 1983; THOMSON, 1985; VELISEK, 2006).

A crescente utilização de inseticidas piretróides comerciais na agricultura mundial, em substituição às classes dos organofosforados e carbamatos, deve-se, em grande parte, à sua menor toxicidade para mamíferos e aves, à sua alta bioeficácia, ao rápido “efeito nocaute” nos insetos e ao seu menor tempo de persistência no ambiente (PARVEZ & RAISUDDIN, 2006). Contudo, esta utilização ampla e crescente acaba por expor ecossistemas aquáticos aos riscos de contaminação, e isso torna os peixes suscetíveis aos efeitos tóxicos desses inseticidas (SMITH & STRATTON, 1986; SOLOMON et al., 2001). Ainda, exposições subletais a piretróides causam mudanças comportamentais e lesões teciduais nos animais (SMITH & STRATTON, 1986).

Apesar da baixa toxicidade verificada para mamíferos, estudos toxicológicos mostraram que dentre 243 pesticidas estudados, os inseticidas piretróides estão entre os mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como peixes e crustáceos (Organização Mundial da Saúde, 1990).

Os piretróides são moléculas compostas pela esterificação de um ácido com um álcool. Os piretróides são divididos em duas categorias: Tipo I e Tipo II. Esta classificação é baseada nos sintomas produzidos em animais experimentais que receberam doses agudas tóxicas dos piretróides, e também na presença ou ausência do grupo alfa-ciano na molécula destes inseticidas (ALDRIDGE et al., 1978; VERSCHOYLE & ALDRIDGE, 1980). Aqueles do Tipo I, como a permetrina e aletrina não possuem um grupo alfa-ciano; enquanto que aqueles do Tipo II, como cipermetrina e deltametrina, possuem um grupo alfa-ciano. Em geral os piretróides do tipo II apresentam ação inseticida mais potente devido justamente à presença deste grupo alfa-ciano em suas estruturas (VIJVERBERG et al., 1982; GLICKMAN & CASIDA, 1982; HOLLOWAY et al., 1989; TABAREAN & NARAHASHI, 1998).

Os sintomas da intoxicação por piretróides estão relacionados à sua estrutura química. Os piretróides do tipo I parecem agir principalmente nos nervos periféricos causando a Síndrome do Envenenamento tipo I ou “Síndrome T”, caracterizada por induzir, em ratos, tremores por todo corpo; comportamento agressivo; aumento da sensibilidade aos estímulos externos; hiperexcitabilidade e convulsões. Em mamíferos não roedores causa paralisia progressiva. Os piretróides tipo II agem preferencialmente 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 (associação entre movimentos involuntários contínuos, uniformes e lentos –atetósicos-; e rápidos, arrítmicos e de início súbito –coreicos-) e, em alguns casos, a movimentos clônicos repetitivos (contrações musculares simétricas curtas e repetitivas com perda do tônus) (VERSCHOYLE, 1980; CANTALAMESSA, 1993; NARAHASHI, 1996; SPENCER, 2001).

O mecanismo de ação dos piretróides inclui efeitos inibitórios nos receptores nicotínicos da acetilcolina; nas Ca^{2+}/Mg^{2+} adenosina trifosfatases (ATPases); nos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, e nos canais de Na^{+} voltagem-dependente das membranas neuronais, sendo estes últimos considerados os principais sítios de ação dos piretróides. Como resultado o principal alvo da toxicidade dos piretróides são células excitáveis, como a célula nervosa e a muscular (NARAHASHI, 1985; SODERLUND &

BLOOMQUIST, 1989; VIJVERBERG & van den BERCKEN, 1990; BRADBERRY et al., 2005). Assim como nos insetos, os piretróides exercem nos vertebrados um efeito significativo sobre os canais de sódio neurais, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons Na^+ para o interior da célula. Tal efeito resulta primeiramente na geração de sucessivos potenciais de ação ou em última instância resulta na impossibilidade de geração de novos potenciais de ação. (CRAWFORD, 1981; NARAHASHI, 1996; SPENCER, 2001; ANADON, 2006).

A inibição de receptores GABA_A representa um mecanismo de ação adicional, proposto para piretróides do tipo II (NARAHASHI, 1991). Os piretróides do Tipo II agem sobre o complexo receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA), ou seja, ligam-se aos receptores do GABA, bloqueando os canais de Cl^- e sua ativação. O GABA é um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados e a ausência de inibição sináptica leva a uma hiperexcitabilidade do SNC (VALENTINE, 1990; MANNA, 2004; BLOOMQUIST, 2007).

Os piretróides sintéticos são metabolizados rapidamente no fígado de mamíferos. A reação inicial de desintoxicação em mamíferos é a clivagem da ligação éster, provavelmente realizada por enzimas carboxiesterases, seguida por reações de hidroxilação por meio do sistema de monooxigenases hepáticas ligadas ao citocromo P-450 e por várias reações de conjugação (HIEDER, 2001). A formação de metabólitos primários e secundários, na metabolização de um piretróide, resulta no aumento significativo de sua solubilidade em água, facilitando assim sua excreção na urina (KALE et al., 1999).

Por serem considerados menos tóxicos aos mamíferos quando comparados com outras categorias de inseticidas como organoclorados e organofosforados, os piretróides têm múltiplos usos na agricultura, na medicina veterinária, no controle de pestes domésticas e na saúde pública, principalmente para controle de vetores transmissores de doenças. Com isso o uso abundante de inseticidas piretróides acaba expondo organismos aquáticos não-alvos, como os peixes, a toxicidade dos mesmos (BARLOW et al., 2001).

Quanto ao emprego de piretróides para controle de vetores, o Ministério da Saúde do Brasil elaborou, em 2003, o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM. No texto do projeto está determinado que o controle químico dos vetores

transmissores da malária deve ser feito com inseticidas piretróides, que devem ser aplicados em domicílios e ambientes abertos, por meio de bombas aspersoras motorizadas ou manuais, costais ou sobre veículos. Contudo, apesar da recomendação do uso de piretróides, não há legislação brasileira específica que regule a presença dos diferentes tipos de piretróides em águas terrestres ou subterrâneas.

A legislação do Brasil, através da Resolução CONAMA 20/1986, substituída pela Resolução CONAMA 357/2005, estabelecia limites máximos para a presença de alguns agrotóxicos em corpos d'água, dando ênfase àqueles da classe dos organoclorados. A nova Resolução de 2005 ampliou a relação de agrotóxicos, incluindo alguns organofosforados e carbamatos.

No entanto, a legislação brasileira ainda não contempla a grande maioria dos inseticidas piretróides que são amplamente empregados atualmente no país (DORES & FREIRE, 2001).

Considerando a ampla utilização de inseticidas piretróides no mundo todo, principalmente no Brasil, bem como os riscos de contaminação de ecossistemas aquáticos, vemos que tais compostos sintéticos merecem destaque nos estudos de toxicidade em organismos não-alvos, como os peixes. A carência de legislação específica para a presença de cada tipo de piretróide sintético em água, também colabora com a necessidade de estudos de toxicidade dos piretróides.

1.3 Deltametrina

A deltametrina é um piretróide do tipo II, sendo estável na luz e ar, mas instável em meio alcalino. São características físicas e químicas da deltametrina: pó cristalino sem cor e odor; densidade (20°) 0,5 g/cm³; massa molecular relativa igual a 505,24; ponto de fusão entre 98-101°C; ponto de ebulição acima de 300 °C; solubilidade em água (20°) menor que 0,2 mg/mL; solúvel em solventes orgânicos (OMS, 1990).

A deltametrina foi sintetizada em 1974, com inclusão do grupamento substituinte alfa-ciano no grupo 3-fenoxibenzil, atribuindo-lhe maior potência inseticida que a permetrina (piretróide Tipo I) (SODERLUND et al., 2001).

A fórmula molecular da deltametrina é C₂₂H₁₉Br₂NO₃; (S)- α -ciano-3-fenoxibenzil-(1R)-cis-3(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato.

Geralmente é preparada por esterificação do ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil) ciclopropanocarboxílico com álcool α -ciano-3-fenoxibenzil (SODERLUND, 2001).

Segundo a resolução ANVISA 61/2003 a deltametrina é uma substância de classificação toxicológica III (moderadamente tóxica a aves e mamíferos) e classificação ambiental I (altamente perigosa). Ainda segundo a mesma resolução, produtos formulados a base de deltametrina, podem ser comercializados, e podem ser aplicados nos mais diversos cultivos da agricultura brasileira: algodão, milho, soja, arroz, café, batata, feijão, banana, cebola, maçã, laranja e outros. Diversos produtos de uso doméstico também tem autorização para serem comercializados.

Inseticidas piretróides cujo princípio ativo é a deltametrina, representam 30% do mercado mundial (KOPRUCU & AYDIN, 2004). A deltametrina está entre os compostos piretróides sintéticos de maior eficácia contra as mais diversas pragas da agricultura e domésticas (BRADBURY & COAST, 1989). Sua ação se dá por meio da paralisação do sistema nervoso dos organismos alvos (VELISEK 2006).

Além do uso na agricultura, produtos a base de deltametrina são empregados em diversas outras atividades: 1) no manejo de florestas, devido a sua eficácia contra um amplo espectro de insetos considerados pragas (VILLARINI et al., 1998); 2) em programas de controle químico de vetores causadores de doenças (malária, por exemplo) em países em desenvolvimento, como a Índia (ANSARI & RAZDAN, 2001) e Brasil; 3) no combate a ectoparasitas de animais domésticos e aves de corte (EL-SAYED et al., 2007); 4) em programas de controle larval em aquicultura (KOPRUCU & AYDIN, 2004) e 5) no controle de doenças causadas por parasitas (ex. *Lepeophtherius salmonis*) em fazendas de cultivo de salmonídeos, por meio de banhos em gaiolas de imersão (BRAIDWOOD & HART 1998; TOOVEY & LYNDON, 2000; ROTH, 2000; MARTINSEN et al., 2001; SEVATDAL & HORSBERG, 2001).

O emprego em larga escala de produtos a base de deltametrina somado ao manejo inadequado, pode acarretar contaminação de ecossistemas aquáticos causando a morte dos peixes ou ao menos, pode interferir e provocar alterações em processos metabólicos dos mesmos (RAND, 1995). Em 1995 foi registrado, no lago Balaton na Hungria, um acidente ambiental que provocou a morte de 30 toneladas de *A. anguilla*, devido à intoxicação com inseticida à base de deltametrina (NEMCSOK et al., 1999).

Sabe-se que a deltametrina, uma vez presente na superfície da água, pode permanecer nela e se deslocar para corpos de água adjacentes (LASKOWSKI, 2002). Segundo dados da OMS (1990) a meia-vida estimada para deltametrina em águas naturais expostas à luz solar foi de 47 dias.

Ao contrário de mamíferos e aves, nos quais a deltametrina tem uma vida curta e é rapidamente metabolizada, registros indicam que peixes parecem ser deficientes em enzimas carboxiesterases, responsáveis pela hidrólise de piretróides. Isso parece tornar a deltametrina, além de tóxica às pragas, tóxica também aos peixes (HAYA, 1989).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o modo de ação neurotóxica da deltametrina, incluindo efeitos sobre canais de sódio da membrana das células nervosas (NARAHASHI, 1982; CASIDA et al., 1983), aumento nos níveis de neurotransmissores como a acetilcolina e dopamina (ERIKSSON & NORDBERG, 1990; MALAVIYA et al., 1993), aumento no consumo de glicose no cerebelo (CREMER et al., 1983), e nos níveis de poliaminas (HUSAIN et al., 1994).

Estudos de BRADBURY & COATS (1989) e EELLS & RASMUSSEN (1993) revelaram que a deltametrina presente em ambientes aquáticos pode ser neurotóxica e letal para peixes em concentrações de 10 a 1000 vezes menor em relação aos valores de letalidade correspondentes para mamíferos e aves (KÖPRÜCÜ & AYDIN, 2004).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos acerca da toxicidade aguda da deltametrina em peixes. URAL e SAGLAM (2005) estimaram a CL_{50;96h} para *O. mykiss* em 0,69 µg.L⁻¹.

Diversos autores relataram valores diferentes de CL_{50;96h} de deltametrina para *Cyprinus carpio*, via exposição hídrica: CALTA & URAL (2004) estimaram em 1,65 µg.L⁻¹; KOPRUKU & AYDIN (2004), 0,074 µg.L⁻¹; LAKOTA et al., (1989), 3,5 µg.L⁻¹; RAO et al., (1983), 78 µg.L⁻¹; SUN (1987), 2,3 µg.L⁻¹; SVOBODOVA et al., (2003), estimaram em 0,058 µg.L⁻¹.

GOLOW & GODZI (1994) estimaram a CL_{50;96h} para *Oreochromis niloticus* expostos a deltametrina em 14,4 µg.L⁻¹. DATTA & KAVIRAJ (2003), trabalhando com *Clarias gariepinus*, estimaram em 0,004 µg.L⁻¹. MESTRES & MESTRES (1992) estimaram a CL_{50;96h} de deltametrina para *O. mykiss*; *C. carpio* e *S. mossambica* em 0,39; 1,84; e 3,5 µg.L⁻¹ respectivamente.

A partir dos resultados relatados nestes estudos, verificamos que apesar de existirem diferenças, todos os valores estimados para toxicidade aguda da deltametrina em peixes estão na escala de microgramas. Isto revela o fato de a deltametrina ser, de fato, tóxico aos peixes.

Dados da OMS (1990), referentes à toxicidade aguda da deltametrina, indicam que o valor da concentração letal $CL_{(1)50;96h}$ para peixes, varia entre 0,4 e 2 $\mu\text{g/L}$, sendo portanto, classificada como extremamente tóxica para estes animais. Todavia, a portaria 1.469/2000 do Ministério da Saúde estabelece limite máximo, para a presença de permetrina (piretróide Tipo I) em águas, igual a 20 $\mu\text{g/L}$. Ainda, não há atualmente no Brasil, limites específicos estipulados para a concentração de deltametrina em águas naturais.

SRIVASTAV e colaboradores, (1997) estudando peixes expostos a deltametrina, verificaram que devido a sua lipofilicidade, uma alta taxa de absorção dessa substância se dá pelas brânquias. Segundo os mesmos autores, este fato torna os peixes um alvo vulnerável à toxicidade deste composto.

De forma geral, a deltametrina afeta o perfil fisiológico dos peixes; em particular o metabolismo energético e antioxidante (KUMAR & GOPAL, 1999). SAYEED e colaboradores, (2003) observaram várias respostas metabólicas adaptativas e compensatórias, induzidas após exposição de peixes a deltametrina.

Outra consequência da intoxicação de peixes por deltametrina, descrita na literatura, é a indução do estresse oxidativo. Muitos pesticidas são reconhecidamente agentes indutores de estresse oxidativo (BANERJEE et al., 2001). A indução de estresse oxidativo e a alteração do sistema antioxidante por piretróides têm sido mostradas por vários autores como, MAITI et al., (1995), GUPTA et al., (1999), KALE et al., (1999) e GABBIANELLI et al., (2002).

Estudos sobre estresse oxidativo em peixes causado por xenobióticos, têm se tornado uma importante ferramenta para a toxicologia aquática. (IMLAY & LINN, 1988; AMES et al., 1993; STADTMAN & BERLETT, 1997; LIVINGSTONE, 2001).

Com isso estudos envolvendo exposição de peixes a produtos formulados a base de deltametrina podem oferecer informações úteis quanto às consequências ecotoxicológicas do uso deste piretróide (SAYEED et al., 2003).

1.4 Biotransformação

Os organismos têm duas formas principais de eliminar um composto químico exógeno – xenobiótico - (como a deltametrina): através da excreção direta do próprio composto ou por meio do processo chamado biotransformação e posterior excreção.

A biotransformação, de forma geral, leva a transformação de um composto lipofílico em um outro de caráter hidrofílico, portanto mais polar, que por sua vez é mais facilmente excretável do que o composto original (VERMEULEN, 1996). Este processo reduz a afinidade do xenobiótico por proteínas do plasma e dos tecidos, principalmente o adiposo, evitando assim a bioacumulação nos mesmos, já que compostos hidrofílicos tendem a ser menos permeáveis nas membranas biológicas (HEATH, 1995).

O processo de metabolização dos xenobióticos ocorre em vários tipos celulares, como células do trato intestinal, brânquias e rim, mas principalmente no fígado (VAN VELD, 1990). A biotransformação altera o tempo de permanência e a toxicidade de um xenobiótico no organismo (LIVINGSTONE, 1998).

A biotransformação pode ser dividida em duas fases. Em geral, as reações enzimáticas de fase I introduzem ou expõem um grupo funcional no xenobiótico, e este processo envolve oxidações, reduções ou hidrólises (HODGSON, 2004).

A principal reação da fase I é a monooxigenação catalisada pela família dos citocromos P450. Esta família está ligada a uma família de genes presente em quase todos os seres vivos, e dada a evolução, atualmente essas enzimas são capazes de realizar ligações com diferentes tipos de xenobióticos. As enzimas de citocromo P450 são hemoproteínas de membrana, que apresentam seu grupo heme localizado na membrana do retículo endoplasmático liso das células. Estas hemoproteínas, em mamíferos ficam muito próximas de outra proteína da membrana, a NADPH citocromo P450 redutase, em uma razão de aproximadamente 10 moléculas de citocromo P450 para uma de redutase (GILMAN, 1996).

O objetivo do sistema de monooxigenases microssomais é oxidação, nas quais um átomo de oxigênio molecular é reduzido à água e o outro é incorporado ao substrato, tornando este, por sua vez, mais reativo e hidrossolúvel e, sendo o NADPH o doador de equivalentes de redução (GOEPTAR, 1995).

O xenobiótico, enquanto substrato reage com a forma oxidada (Fe^{3+}) do citocromo P450 para formar um complexo enzima-substrato. O citocromo P450 redutase aceita um elétron do NADPH que, por sua vez, reduz o complexo oxidado citocromo P450-xenobiótico. O complexo citocromo P450 substrato reduzido (Fe^{2+}) reage, então, com oxigênio molecular e com um outro elétron do NADPH doado através da mesma flavoproteína redutase para formar uma espécie de oxigênio ativado (GOAPTAR et al., 1995).

Quando o ferro é reduzido, ele pode se ligar ao monóxido de carbono (CO) e passa a absorver luz no comprimento de onda de 450 nm (GOAPTAR et al., 1995) o que confere o nome de citocromo P450. Nas etapas finais, um átomo de oxigênio é liberado como água e o outro é transferido para o xenobiótico. Após a liberação do substrato oxidado, a enzima citocromo P450 é regenerada. Durante as reações em que o ferro é reduzido pode ocorrer o vazamento de espécies reativas de oxigênio, (PORTER & COON, 1991; WINSTON 1991; HODGSON, 2004; VALAVADINIS et al, 2006) como mostra a FIGURA 1. As espécies reativas de oxigênio que podem ser formadas são ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (GOEPTAR et al., 1995).

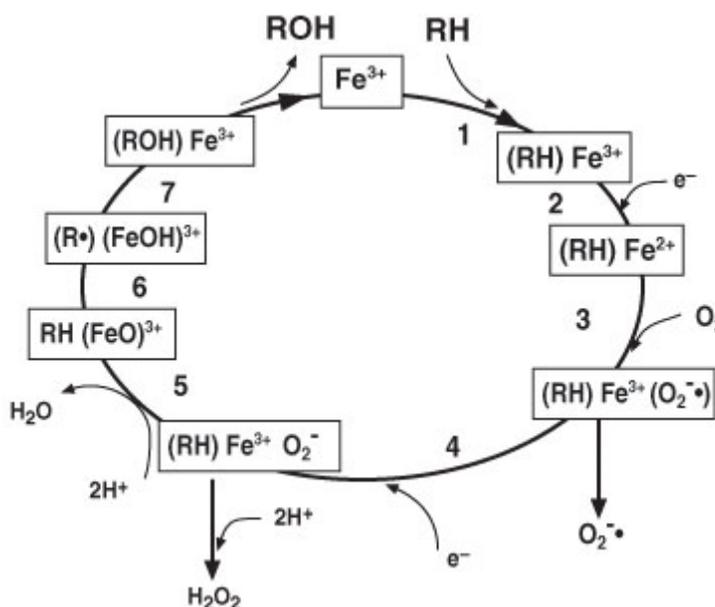


FIGURA 1 – Esquema simplificado do mecanismo de ação do citocromo P450. Neste ciclo, inicialmente, o citocromo aparece com o ferro oxidado, RH e ROH são o substrato e o produto, respectivamente. É um ciclo de óxido-redução, com a geração de O^{2-} e H_2O_2 (ORELLANA & GUAJARDO, 2004).

As principais reações relacionadas com o metabolismo da deltametrina são oxidações mediadas pelo sistema microsomal de monooxigenases. Esta parece ser a principal via de metabolização da deltametrina em peixes (KOPRUCU et al., 2008). As vias de degradação da deltametrina em bovinos, aves e peixes são similares àquelas observadas em roedores (FIGURA 2) (IPCS, 1989). Contudo, estudos comparativos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que os peixes possuem uma capacidade menor de metabolizar e eliminar inseticidas piretróides (GLICKMAN e LECH, 1982).

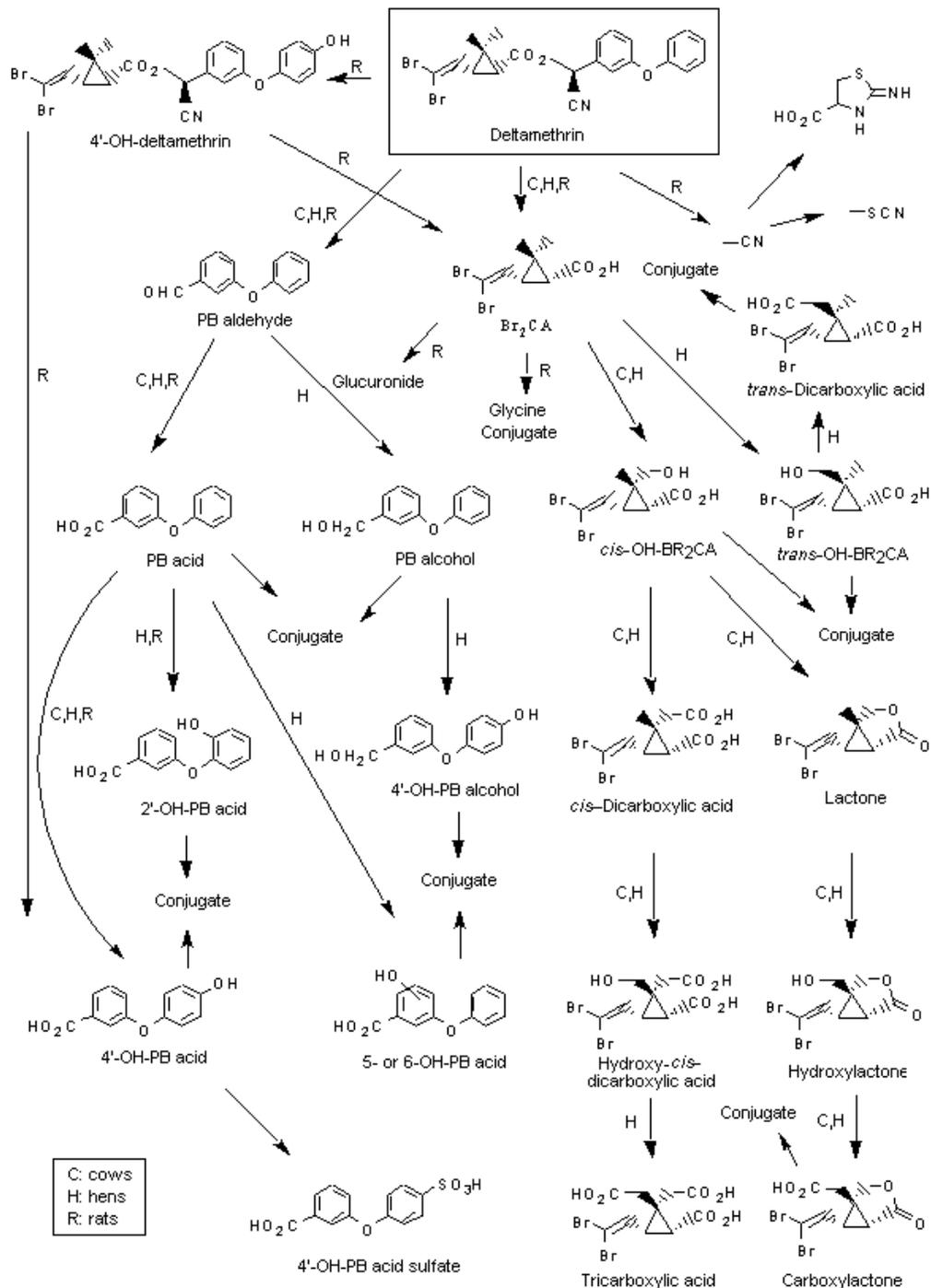


Figure 1. Pathways of metabolism of deltamethrin in mammals

Figura 2. Fonte: MCGREGOR, D. B. Pesticide residues in food 2000: Deltamethrin. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 2000.

As reações da fase II da biotransformação são de conjugação do xenobiótico com compostos endógenos. As principais enzimas responsáveis pelas reações desta fase são: uridina difosfato glicuronosil transferases (UDPGT), sulfotransferases e glutathione-S-transferase (GST). A conjugação é uma ligação covalente entre o grupo funcional do xenobiótico com, por exemplo, um ácido glicurônico, um sulfato, uma glutathione reduzida, um aminoácido ou um acetato. Geralmente o conjugado formado é inativo. Todavia, o produto a ser excretado pode ser formado somente pela fase I ou fase II ou pelas duas fases. As conjugações que ocorrem na fase II têm a finalidade de adicionar grupos químicos maiores e mais polares nos xenobióticos para facilitar ainda mais a excreção destes compostos (HODGSON, 2004).

Alguns compostos xenobióticos já possuem grupos funcionais (COOH; -OH ou NH₂) requeridos para as reações da fase II e podem então, ser metabolizados diretamente por meio desta fase apenas. Outros compostos, por não possuírem tais grupos funcionais, precisam ser metabolizados de forma integrada, por meio das reações de fase I e de fase II (GEORGE, 1994; LECH & VODICNIK, 1985).

1.5 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A biotransformação de xenobióticos (ciclo “redox”) pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) em concentrações que ameaçam a integridade estrutural e funcional das células (PORTER & COON, 1991; HODGSON, 2004; VALAVANIDIS et al., 2006).

ERO são moléculas pequenas, instáveis, de meia-vida curta e altamente reativas (WINSTON, 1991; ABDALLA, 1993). São essenciais para o controle fisiológico da função celular em sistemas biológicos, e são produzidas continuamente nas células (HALIWELL & GUTERIDGE, 1999).

O metabolismo celular básico dos seres aeróbicos envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (VALAVANIDIS, 2006). A respiração celular, por exemplo, resulta na redução do oxigênio molecular (O₂), por meio da cadeia transportadora de elétrons, com a formação de água. Esta redução do oxigênio ocorre por meio de quatro reações sucessivas, de reduções com um elétron. Nestas etapas são formados produtos intermediários altamente reativos denominados como espécies reativas de oxigênio (ERO): o radical ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical

hidroxila (OH•). Estes são compostos instáveis que podem agir como pró-oxidantes dentro das células (KELLY et al., 1998).

Estima-se que até 5% destas ERO produzidas na cadeia respiratória “escapam” e oxidam componentes celulares, tais como membranas, prejudicando sua permeabilidade; oxidam grupos amina e tiol de proteínas, inativando-as, e atacam o material genético, podendo alterar a expressão gênica (PUNCHARD & KELLY, 1996). Contudo, a produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos foi acompanhada, ao longo da evolução dos organismos, pelo desenvolvimento de muitos mecanismos celulares de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares de ERO e impedir a indução de danos (SIES, 1993).

O oxigênio no seu estado molecular é essencial para muitos processos metabólicos vitais dos seres aeróbicos. Esta dependência de oxigênio, de certa forma, força os seres aeróbicos a lidar com a toxicidade deste átomo (AHMAD, 1995). A partir disto criou-se o termo “paradoxo da vida aeróbica”, que se refere ao fato de organismos aeróbicos não poderem existir sem oxigênio, sendo, porém, constantemente expostos ao risco de estresse oxidativo (DAVIES, 2000).

O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de ERO na célula excede a sua taxa de remoção (SIES, 1986) e é representado por peroxidação de lipídeos insaturados das membranas celulares; danos a proteínas e DNA; alterações nas atividades de enzimas antioxidantes, nos receptores e nos transportadores de membrana. Todos estes processos podem culminar em danos irreparáveis que causam a morte celular (PRADHAM et al., 1990; KOTKAT et al., 1999; SALVI et al., 2000; VALAVANIDIS, 2006).

A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode se dar tanto durante a fosforilação oxidativa na mitocôndria, como pelos neutrófilos durante o ataque às bactérias e outros microorganismos (esta formação é extremamente importante para a eficiência da resposta imunológica) (SILVEIRA, 2004).

O radical superóxido (O_2^-) também pode ser formado pela autooxidação da hemoglobina, mioglobina, citocromo C reduzido, catecolaminas, quinonas e fenóis poliídricos (CANADA & CALABRESE, 1989). Outra forma de produção ocorre durante os exercícios físicos, pois existe uma maior demanda de oxigênio (35% maior) pela

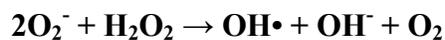
musculatura durante a atividade (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Este radical pode oxidar catecolaminas, tocoferóis, ascorbato, tióis; bem como as enzimas antioxidantes catalase e glutathione peroxidase e outras substâncias presentes na célula (KONO & FRIDOVICH, 1983; MASHINO, 1987;; ODAJIMA, 1972).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser formado a partir do ânion superóxido, através da reação da dismutação natural ou pela enzima superóxido dismutase (SOD) (SALTMAN, 1989). Enzimas citoplasmáticas, mitocondriais (succinato desidrogenase e ácido graxo desidrogenase) e peroxissomais (lactato oxidase, urato oxidase, d-aminoácido oxidase) geram peróxido de hidrogênio diretamente. Ele é considerado um agente oxidante fraco, porém oxida grupos tiol e alguns aminoácidos, podendo inativar enzimas (ABDALLA, 1993).

Existem duas vias principais de produção de radical hidroxila $\text{OH}\cdot$ em sistemas biológicos: a primeira via é a das radiações ionizantes. A segunda via é a interação com metais de transição. Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio (H^+), na presença de metais de transição como íons ferro ou cobre, é formado o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), que é o mais reativo deles, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima, e assim, atuar em enzimas, membranas ou ácidos nucleicos (ABDALLA, 1993). A reação é conhecida como reação de Fenton:



Os íons dos metais de transição ferro e cobre podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à produção de radical hidroxila, a chamada reação de Haber-Weiss:



O radical hidroxila é extremamente reativo, ou seja, uma vez formado, tem uma meia-vida extremamente curta, reagindo rápida e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, causando lesões no DNA, proteínas, açúcares e lipídios (ABDALLA, 1993). O radical hidroxila é o que apresenta um menor tempo de vida (SIES, 1991).

Outros tipos de espécies reativas de oxigênio importantes são o radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$), que é o radical de tempo de vida mais longo, causando vários problemas

biológicos como a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS); óxido nítrico (NO•); peroxinitrito (ONOO-) e radical semiquinona (Q•) (SIES, 1991).

A intoxicação por xenobióticos pode então, levar ao aumento da concentração de ERO na célula de algumas formas: 1) através da inibição do transporte de elétrons na cadeia respiratória, o que leva ao acúmulo dos intermediários reativos; 2) por meio de inibição de algumas enzimas específicas (antioxidantes) ou 3) sendo metabolizados por meio das reações de fase I (“ciclo redox”) da biotransformação (NOHL & HEGNER, 1981; KELLY et al., 1998).

1.6 Sistemas de defesa antioxidante & Estresse oxidativo

Como visto, a exposição a compostos químicos (como a deltametrina) pode levar a um aumento na concentração de ERO na célula. O desbalanço entre a geração e a neutralização de ERO no organismo caracteriza uma situação de estresse oxidativo (DAVIES, 1995). Estudos sobre estresse oxidativo induzido por inseticidas à base de deltametrina e a influência nos mecanismos antioxidantes de peixes e outros organismos aquáticos, podem oferecer informações úteis sobre as conseqüências ecotoxicológicas do uso deste xenobiótico (SAYEED et al, 2003).

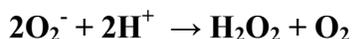
Organismos aeróbicos desenvolveram ao longo da evolução, mecanismos de defesa antioxidante que têm como função prevenir danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio (ERO). Sistemas biológicos têm mecanismos enzimáticos e não enzimáticos adaptados, que protegem os componentes celulares contra danos causados por oxidação (VALAVANIDIS et al., 2006). Os peixes são capazes de sintetizar e controlar tais sistemas de defesa conforme as condições ambientais, de modo a estarem aptos a lidar com situações de estresse oxidativo (FENECH & FERGUSON, 2001). Para tanto, ocorre um aumento induzido na síntese das enzimas do sistema de defesa antioxidante (YOUNG & WOODSIDE, 2001; MARTINS et al., 1991).

Portanto, existe um sistema de defesa antioxidante na célula, que pode ser dividido em: enzimático e não enzimático. Ambos proporcionam a capacidade de lidar com situações de estresse oxidativo, inibindo ou diminuindo a oxidação resultante da ação das espécies reativas de oxigênio (ERO) (ABDALLA, 1993; McCORD, 2000).

O sistema antioxidante enzimático é composto por enzimas como a superóxido-dismutase (SOD); catalase (CAT); glutathione peroxidase (GPx); glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); glutathione-S-transferase (GST), entre outras.

Superóxido dismutase (SOD)

São enzimas que retiram o radical superóxido O_2^- , na medida em que catalisam a seguinte reação (dismutação):

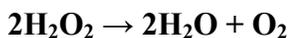


Existem três formas de SOD em eucariotos: 1) Cu/Zn-CU SOD; citoplasmática e formada por 2 subunidades com 16kDa cada, contendo um átomo de cobre e um de zinco; 2) Mn SOD; mitocondrial e formada por um homotetrâmero, também com 16 kDa cada subunidade, e cada uma delas contendo um átomo de manganês e 3) Cu-Zn EC-SOD; extracelular, é secretada pelos fibroblastos e células gliais em humanos (McINTYRE et al., 1999; ZELKO et al, 2002). A reação catalisada pela SOD é essencial para a eliminação de O_2^- gerado na cadeia respiratória e por oxidases, bem como é a principal fonte de H_2O_2 nas células (NORDBERG e ARNER, 2001).

Catalase (CAT)

A catalase está localizada nos peroxissomos e é encontrada em todos os organismos aeróbicos, sendo considerada uma enzima amplamente distribuída e bem conservada, e com rápida capacidade de degradação do H_2O_2 , aproximadamente 10^{-7} minutos. Também é considerada um passo evolutivo extremamente importante, pois permitiu aos organismos viverem em ambientes aeróbicos (SCANDALIOS, 2005). A catalase é uma enzima tetramérica, na qual cada subunidade apresenta 60kDa, com um grupo heme por tetrâmero (KIRKMAN & GAETANI, 1984).

A importância desta enzima está no fato de evitar que o H_2O_2 produzido na célula se transforme no radical hidroxila OH^\bullet , que é extremamente reativo. A reação catalisada é a seguinte:



Glutathione Peroxidase (GPx)

A outra via de degradação do peróxido de hidrogênio é a enzima glutathione peroxidase (GPx), que também é capaz de utilizar outros peróxidos. Além disso, a enzima GPx utiliza a glutathione reduzida (GSH) como doadora de elétrons para este processo:



A glutathione peroxidase é uma enzima citosólica que depende da renovação de glutathione reduzida no meio. A enzima glutathione reductase é a responsável pela manutenção do teor de glutathione reduzida (GSH), por meio da seguinte reação:



A importância da GPx reside no fato de ela ser uma alternativa eficiente para manter níveis baixos de H_2O_2 na célula, uma vez que pouca quantidade de catalase é encontrada no citosol.

Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A glicose-6-fosfato desidrogenase está presente no citoplasma de todas as células. Esta é uma enzima importante da fase oxidativa da via das pentoses, pois produz NADPH para a célula (SALTMAN, 1989), por meio da seguinte reação:



Embora a defesa das células contra o H_2O_2 não dependa diretamente da G6PDH, esta enzima é também importante, pois atua na formação de NADPH necessário para a atividade das enzimas antioxidantes. O NADPH atua como doador de hidrogênio em várias rotas metabólicas, bem como age sobre a estabilidade da catalase (KIRKMAN & GAETANI, 1984) e na regeneração da forma reduzida da glutathione por meio da atividade da glutathione reductase (GR), ambas essenciais para a desintoxicação do peróxido de hidrogênio (via glutathione peroxidase).

Glutathione-S-transferase (GST)

As GST compõem uma família de enzimas desintoxicadoras que catalisam a conjugação de glutathione reduzida (GSH) com uma variedade de xenobióticos. As GST são enzimas predominantemente da fração citosólica (95%), e uma pequena porção (5%) pertence à fração microsomal (retículo endoplasmático) e mitocondrial. Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em bactérias, insetos, moluscos, peixes, anfíbios, mamíferos e plantas (RODRIGUES, 2003). A conjugação de

xenobióticos com a GSH, torna-os mais hidrofílicos, o que facilita a excreção dos mesmos (WANG & BALLATORI, 1998; REGOLI et al., 2002; ORUC et al., 2004).

Quanto ao sistema de defesa antioxidante não enzimático, este é composto por moléculas que têm a função de ajudar o organismo no “ataque” às espécies reativas de oxigênio. As principais moléculas são: ácido ascórbico, glutatona reduzida, vitamina E ou α -tocoferol, caroteno flavonóides, proteínas do plasma, melatonina, metalotioneínas, selênio, clorofilina, L-cisteína, curcumina, ubiquinona e outras (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SILVEIRA, 2004; VALAVADINIS et al., 2006).

Glutaciona reduzida (GSH)

A glutaciona reduzida é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido γ -glutâmico, e atua como um “seqüestrador” de radicais hidroxila, de oxigênio singlete e do radical superóxido.

Também atua como co-fator de várias enzimas em diferentes vias metabólicas; participa do processo de desintoxicação (como substrato da glutaciona-S-transferase) durante a conjugação com xenobióticos e também na remoção de peróxidos via glutaciona peroxidase (ABDALLA, 1993).

Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, e é encontrado como ascorbato em pH fisiológico. Tem a função de ser co-fator de enzimas, como da prolina e lisina hidroxilases, envolvidas na biossíntese do colágeno; e da dopamina β hidroxilase, que converte a dopamina em adrenalina. É um poderoso antioxidante, podendo reagir rapidamente com radical superóxido, por exemplo. Os tecidos que apresentam as maiores concentrações de ácido ascórbico em peixes são o rim, o fígado, o cérebro e as brânquias (CARR et al., 1983).

Neste cenário a avaliação das enzimas antioxidantes, bem como das substâncias antioxidantes, pode oferecer indicações acerca do status antioxidante dos organismos e podem então, servir como biomarcadores de estresse oxidativo induzido por poluentes (VALAVANIDIS, 2006).

CANADA e CALABRESE (1989) demonstraram que a atividade da SOD hepática de mamíferos pode aumentar ou diminuir em função da exposição a vários xenobióticos. Similarmente, em peixes, a atividade da SOD aumenta em decorrência da

exposição a poluentes que contenham organoclorados (ROBERTS et al., 1987) e hidrocarbonetos (LIVINGSTONE, 1993). Juvenis de *I. punctatus* expostos a efluentes industriais, tiveram apenas a atividade da CAT aumentada, enquanto que a SOD e GPx não variaram. Ainda, trutas expostas aos mesmos efluentes tiveram a atividade da SOD aumentada, bem como da CAT, porém a GPx não variou (MARTHER-MINAICH e Di GIULIO, 1991). ZHANG e colaboradores (2004) demonstraram que as atividades da CAT, SOD e GPx hepáticas em “goldfish” aumentaram durante exposição crônica ao 2,4-diclorofenol.

A busca de biomarcadores, segundo STEGEMAN e colaboradores (1992), justifica-se pelo fato de que estes permitem detectar uma contaminação ambiental, avaliar sua magnitude, e identificar espécies ou populações em risco de contaminação.

Estudos sobre estresse oxidativo induzido por xenobióticos e seus efeitos nos vários elementos antioxidantes dos peixes, têm proporcionado informações úteis a respeito das consequências ecotoxicológicas do uso de inseticidas à base de deltametrina (AHMAD et al., 2000). Nestes estudos vêm sendo demonstrado que os componentes antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) dos peixes podem servir como biomarcadores de exposição a poluentes aquáticos.

São diversos os trabalhos envolvendo avaliação das enzimas e moléculas do sistema de defesa antioxidante de peixes expostos a deltametrina. SAYEED e colaboradores, (2003) demonstraram que exemplares de *Channa punctatus* expostos por 48 horas a deltametrina, apresentaram redução da atividade da catalase da ordem de 45%, 43%, 33%, no fígado, rim e brânquias, respectivamente. Neste mesmo estudo eles verificaram um aumento nas atividades da glutathione-S-transferase e glutathione peroxidase no fígado e no rim, enquanto que nas brânquias ocorreu uma redução de atividade das mesmas. Com relação aos antioxidantes não enzimáticos, os autores encontraram resultados indicando um aumento no conteúdo de glutathione reduzida (GSH) no fígado, rim e brânquias; enquanto que o conteúdo de ácido ascórbico aumentou no rim e diminuiu nas brânquias.

PIMPAO e colaboradores, (2006) demonstraram que juvenis de *Ancistrus multispinis* expostos a deltametrina, apresentaram redução de atividade da GST hepática. Por outro lado ocorreu redução da atividade desta enzima nas brânquias.

YOUSEF e colaboradores, (2006) trabalhando com ratos tratados com deltametrina, observaram uma redução de atividade da SOD plasmática, e propuseram que ela está envolvida no processo de defesa antioxidante. Porém, foram feitos poucos estudos envolvendo exposição de peixes a deltametrina, e levando-se em consideração a SOD, e por isso torna-se relevante avaliar os possíveis efeitos de produtos a base de deltametrina na atividade desta enzima.

Com relação aos parâmetros não enzimáticos de defesa antioxidante do animal, está bem estabelecido na literatura que a glutathiona reduzida (GSH), bem como o ácido ascórbico, possuem propriedades antioxidantes, essenciais à sobrevivência do animal quando em situação de estresse oxidativo (HASSPIELAR et al., 1994).

SAYEED e colaboradores, (2003) trabalhando com exemplares de *Channa punctatus* expostos a deltametrina, registraram elevação na concentração de GSH no fígado, rim e brânquias, da ordem de 52%, 338% e 386% respectivamente. O ácido ascórbico mostrou-se em maiores concentrações no rim e fígado, e menores nas brânquias, quando comparado com peixes não expostos.

Além das enzimas e substâncias antioxidantes, outras enzimas como, por exemplo: alanina aminotransferase (ALAT); aspartato aminotransferase (ASAT) e fosfatases alcalina (FALC) e ácida (FAC), quando presentes no plasma sanguíneo podem agir como biomarcadores de lesões ao fígado, rim e brânquias; e por isso também vem sendo investigadas em estudos de estresse oxidativo induzido por xenobióticos (VENKATESWARA RAO, 2006).

SAYEED e colaboradores, (2007) observaram que juvenis de tilápia do Nilo expostos a deltametrina, em condições laboratoriais, sofreram aumento de atividade enzimática, da fosfatase alcalina, e das transaminases (ALAT e ASAT) no plasma.

1.7 O matrinxã

Com o propósito de avaliar as conseqüências ecotoxicológicas do uso da deltametrina nosso estudo utilizou como modelo a espécie *Brycon amazonicus*, (SPIX & AGASSIZ, 1829) popularmente conhecido como matrinxã.

Anteriormente o matrinxã era chamado de *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869), porém novos estudos definiram que *B. cephalus* e *B. amazonicus* eram a mesma espécie,

e o nome mais antigo se manteve (LIMA, 2003). Esta espécie pertence à família Bryconidae, ordem Characiforme, e superordem Ostariophysi.

B. amazonicus é um peixe de piracema, portanto é reofilica, que necessita nadar contra a correnteza dos rios para migrar e realizar a desova, entre dezembro e fevereiro. No auge de seu desenvolvimento pode chegar a pesar 4 quilos e alcança sua maturidade sexual com cerca de três anos de idade. Seu corpo é alongado com uma coloração escura na região dorsal até o pedúnculo caudal. A região lateral e a parte ventral apresentam uma cor prateada intensa. As nadadeiras apresentam-se sempre com uma marcante pigmentação preta. A coloração desse animal varia muito pouco ao longo do seu desenvolvimento de jovem a adulto (ZANIBONI FILHO et al., 1988). É um peixe considerado onívoro com uma preferência a herbivoria. Uma análise do seu trato intestinal revelou uma grande e variada quantidade de frutos e insetos (VAL & HONCZARYK, 1995).

Por apresentar adaptabilidade satisfatória às condições de cativeiro, bem como boa aceitação de alimentação artificial e apresentar excelentes índices de crescimento, o matrinxã vem sendo muito utilizado por produtores de peixes no estado de São Paulo, tanto para a pesca esportiva quanto para a alimentação, apesar de ser espécie originária da bacia amazônica (CASTAGNOLLI, 1992; ZANIBONI-FILHO et al., 2006).

Considerando que existem poucos estudos acerca da toxicidade de inseticidas comerciais à base de deltametrina em peixes cultiváveis no Brasil, como o matrinxã, nossa proposta foi avaliar os efeitos tóxicos de um inseticida piretróide sobre matrinxãs juvenis, via exposição hídrica. Para isso enfatizamos os mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa antioxidante da espécie.

1.8 Inseticida piretróide KESHET[®]

O inseticida comercial, formulado a base de deltametrina, escolhido para a exposição de juvenis de matrinxã é o Keshet[®] (nº MAPA: 09201, ANVISA). Este é um pesticida com alta demanda comercial, amplamente empregado nos mais diversos cultivos da agricultura. O Keshet[®] foi gentilmente cedido pela empresa Milênia Agrociências S/A, responsável pela sua formulação, localizada na cidade de Londrina-PR.

2. OBJETIVOS

Com a proposta de avaliar os efeitos da deltametrina (na formulação comercial Keshet®) em juvenis de *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829), durante exposição, via hídrica, a uma concentração subletal (10% CL₍₁₎50;96h), enfatizamos o sistema de defesa antioxidante desta espécie, com os seguintes procedimentos, na ordem abaixo:

1. Experimento de determinação da toxicidade aguda de deltametrina para juvenis de *B. amazonicus*.
2. Exposição de juvenis de *B. amazonicus* a uma concentração subletal (10% da CL₍₁₎50;96h) de deltametrina por 96 horas e avaliação dos seus efeitos no sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático do fígado, rim e brânquias.
3. Determinação da capacidade de recuperação dos juvenis de *B. amazonicus* após um período de 10 e 20 dias de pós-exposição a deltametrina, por meio da avaliação dos seus efeitos no sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático do fígado, rim e brânquias.

3. METODOLOGIA

Os animais que foram utilizados nos experimentos descritos a seguir foram adquiridos na piscicultura comercial “Águas Claras” – Mococa – SP e trazidos às instalações do Laboratório de Bioquímica Adaptativa - UFSCAR, onde permaneceram em tanques com capacidade de 2000 litros para um período de aclimação e crescimento.

Estes tanques possuem aeração constante e temperatura controlada em 26°C. Os peixes foram submetidos à foto-período natural e inicialmente foram alimentados durante um mês com ração comercial contendo 40% de proteína, passando então a serem alimentados com ração contendo 28% de proteína. Periodicamente, os animais foram submetidos a registros de biometria.

Ao final do período de aclimação, os animais foram retirados dos tanques de 2000 litros para novos registros de biometria e em seguida, foram transportados para os tanques de teste, de mesma qualidade da água dos tanques anteriores (mas de volume igual a 250 litros), nos quais permaneceram por 20 dias para aclimação ao novo ambiente. Os peixes foram então privados de alimentação por 24 horas antes da aplicação do protocolo experimental e durante toda a exposição a deltametrina (ABNT, 2004).

Avaliação Ética

Toda a metodologia aplicada nos experimentos de exposição dos peixes a deltametrina, bem como os procedimentos aplicados no manuseio dos peixes e na coleta do material biológico, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Parecer nº 04/2008) da CEEA-UFSCAR, em reunião realizada em março de 2008.

3.1 Determinação da toxicidade aguda $CL_{(1)50;96h}$ da deltametrina (Keshet[®]) em juvenis de matrinxã.

Antes da realização do teste definitivo, foram feitos testes preliminares que permitiram determinar a menor concentração de deltametrina (na formulação Keshet[®]) que resulta em 100% de mortalidade dos peixes.

O teste definitivo foi então realizado em sistema estático, com aeração constante (6,2 mg/L); temperatura controlada (24,8 °C) e pH 7,2. Foram utilizados sete tanques de

250 litros, com 10 peixes ($16 \pm 0,3$ g; $11 \pm 0,9$ cm) em cada. A densidade em cada tanque não excedeu 1 g/L (OECD, 1992).

Foram ensaiadas seis diferentes concentrações (escolhidas baseado em dados obtidos nos testes preliminares) de deltametrina: 1,4; 2,4; 3,4; 4,4; 5,4; 6,4 $\mu\text{g/L}$. Um tanque ficou livre de deltametrina durante todo o experimento, servindo como grupo Controle.

Durante todo o teste outros parâmetros de qualidade de água foram monitorados a cada 12 horas: condutividade ($86 \mu\text{S/cm}^3$), alcalinidade (77 mg/L CO_3^-), dureza (57 mg/L CaCO_3) e amônia ($0,13 \text{ mg/L NH}_3$) e nitrito ($0,0064 \text{ mg/L}$).

A cada 24 horas o número de animais mortos em cada tanque foi registrado para posterior cálculo da $CL_{(1)50;96h}$.

3.2 Exposição subletal de juvenis de matrinxã a 10% $CL_{(1)50;96h}$ de deltametrina (Keshet[®])

Neste experimento foram utilizados 120 exemplares de matrinxã ($46 \pm 1,5$ g; $14 \pm 1,1$ cm) divididos igualmente em doze lotes em tanques idênticos de 250 litros, em sistema estático, sendo 10 peixes por tanque. Seis tanques foram ensaiados como Controle, ficando em água livre de deltametrina. Os outros seis tanques foram expostos a **0,26 $\mu\text{g/L}$** de deltametrina (10% da $CL_{(1)50;96h}$) em tanques idênticos aos dos controles.

Depois de 96 horas transcorridas do início da exposição a deltametrina, dois tanques controle e dois expostos foram escolhidos aleatoriamente, e destes tanques foram retirados seis animais de cada, totalizando doze animais por lote; sendo 12 peixes do grupo Controle e 12 peixes expostos a deltametrina.

Os parâmetros de qualidade da água: oxigênio ($6,4 \text{ mg/L}$); temperatura ($25,3 \text{ }^\circ\text{C}$), pH ($7,2$); condutividade ($97 \mu\text{S/cm}^3$); alcalinidade (89 mg/L CO_3^-); dureza (68 mg/L CaCO_3); amônia ($0,117 \text{ mg/L NH}_3$) e nitrito ($0,0039 \text{ mg/L}$) dos tanques experimentais foram medidos a cada 12 horas.

A coleta do material biológico se deu com a utilização de seringas heparinizadas para a coleta de sangue através de punção caudal, para obtenção do plasma. Em seguida os animais foram sacrificados para a excisão dos tecidos. A coleta dos tecidos foi

realizada com o auxílio de material cirúrgico; placas de Petri; solução salina fisiológica e gelo. Os tecidos, juntamente com o plasma obtido, foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para preservação do material usado nos ensaios laboratoriais dos elementos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, das fosfatases e transaminases.

3.3 Recuperação da exposição a deltametrina por 10 e 20 dias

Os tanques restantes: quatro expostos a deltametrina e quatro não (controles), foram então submetidos a dois períodos distintos de recuperação. Nessa fase todos os tanques ficaram livres de deltametrina, e com renovação de água a cada 24 horas. A recuperação foi estimada 10 e 20 dias após a exposição.

Ao final de cada intervalo de recuperação, seis animais de cada tanque foram retirados e sacrificados, totalizando doze animais por intervalo por lote: 12 peixes do grupo controle e 12 expostos a deltametrina (recuperação 10 dias); e 12 peixes do grupo controle e 12 expostos a deltametrina (recuperação 20 dias).

Todo o procedimento de coleta de material biológico foi feito como já descrito.

3.4 Determinação dos parâmetros de qualidade da água.

3.4.1 Oxigênio, temperatura, condutividade e pH

Os teores de oxigênio e a temperatura foram determinados eletrometricamente com oxímetro YSI-55; a condutividade com um Check Mate II Corning e o pH com um pHmetro Orion 710.

3.4.2 Dureza

Amostras de água de cada caixa, contendo 100 mL, foram usadas na determinação da dureza da água. As amostras foram inicialmente tamponadas com 2 mL tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ (dissolvidos 67,5 g de NH_4Cl em 570 mL de NH_4OH e completado para um litro com água destilada). Em seguida, acrescentou-se 8 gotas da solução indicadora ericromo negro T (dissolvida 4,5 g de NH_2OH em HCl e 0,5 g de ericromo negro T em 100 mL de etanol). Esta solução foi então titulada com solução de

EDTA (0,4 % com $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 %) até o ponto de viragem de lilás para azul puro. Para o cálculo da dureza em $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$ foi utilizada a seguinte fórmula:

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

3.4.3 Alcalinidade

As determinações de alcalinidade foram efetuadas segundo a técnica descrita por GOLDSTEIN & CLYMO (1969). As amostras de água contendo 100 mL foram coletadas para as determinações de alcalinidade. Para a análise utilizou-se o ácido sulfúrico 0,01 N como indicador da alcalinidade para titular até o pH 4,0. Para o cálculo da alcalinidade das amostras, em mg/L de carbonatos e bicarbonatos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Alcalinidade} = (\text{mL de H}_2\text{SO}_4) \cdot N \cdot 50000 / \text{vol. da amostra (mL)}$$

sendo N = normalidade do ácido sulfúrico.

3.4.4 Amônia

A concentração de amônia nos tanques foi determinada por nesslerização (método modificado de GENTZKOW & MASEN, 1942). Foram adicionados 0,5 mL de reativo de Nessler a 2,0 mL de amostra de água. Após 20 minutos, a leitura óptica foi realizada em 420 nm. A concentração de amônia foi então estimada contra um padrão de amônia contendo 100 nmols.

3.4.5 Nitrito

O nitrito foi determinado segundo TAVARES (1994) utilizando-se 5 mL da amostra da água. Às amostras foram adicionados 100 μL de sulfanilamida (58,07 mM) seguido de agitação e repouso por 10 minutos. Após este período adicionou-se 100 μL de solução de bicloridrato N-1 naftilenodiamina (3,86 mM). O produto da reação, de coloração rosa escura, foi determinado colorimetricamente em 540 nm. A concentração de nitrito foi estimada a partir de um padrão de nitrito contendo 50 nmols.

3.5 Proteína nos homogeneizados de tecidos

A determinação da concentração de proteína total nos homogeneizados de tecidos utilizados nas determinações enzimáticas foi realizada segundo o método descrito por KRUGER (1994).

Neste método utiliza-se o reagente de BRADFORD, que consiste de uma mistura de 100 mL ácido fosfórico (85 %), 50 mL de etanol (95 %) e 100 mg de “Comassie Brilliant Blue”, e completando-se o volume para um litro. Esta mistura foi filtrada 2 vezes e armazenada a 4 ° C.

Depois de feitas as diluições apropriadas para cada tecido, 10 µL de cada homogeneizado foram adicionados em duplicata numa micro-placa; em seguida 190 µL do reagente de BRADFORD foram adicionados em cada amostra. A leitura da placa foi realizada após 10 minutos de descanso (ambiente escuro), em 600 nm utilizando um leitor de micro placas.

3.6 Determinações Enzimáticas – Enzimas Antioxidantes

As atividades enzimáticas da Superóxido dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e Catalase (CAT); e o conteúdo de glutathione reduzida (GSH) nos tecidos, foram determinados segundo os métodos de BEUTLER (1984).

Preparação dos homogeneizados de tecido para SOD, CAT, GPx, G6PDH e GST.

Os homogeneizados de tecidos foram preparados em tampão de homogeneização fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 contendo sacarose 0,25 M. As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador tipo Turrax em banho de gelo, e em baixa velocidade. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 15000 x g a 4 °C. Os sobrenadantes, contendo concentrações conhecidas de proteína, foram utilizados para as determinações enzimáticas. Os homogeneizados de tecidos utilizados na determinação enzimática da GST foram centrifugados por 35 minutos a 15000 x g a 4 °C.

3.6.1 Superóxido Dismutase total – SOD

A determinação da atividade da SOD foi realizada a partir do princípio de auto-oxidação do pirogalol, que é inibido na presença da SOD. Alíquotas de tecido foram

homogeneizadas em tampão de homogeneização (fosfato-sacarose) e diluídas apropriadamente no mesmo tampão.

A determinação da superóxido dismutase foi então realizada em uma cubeta de 3 mL, onde foram adicionados 200 μL de Tris HCl-EDTA 1 M, pH 7,5; e um gradiente de volumes do homogeneizado diluído, completando-se o volume para 1960 μL com água destilada. As amostras foram então pré-incubadas a 25°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 40 μL de pirogalol 10 mM (em HCl 10 mM). A variação da densidade óptica foi determinada em 420 nm, em reações cinéticas de 2 minutos, com registros a cada 10 segundos. O cálculo da atividade da SOD foi feito sabendo-se que uma unidade (U) de SOD inibe 50 % da auto-oxidação do pirogalol.

3.6.2 Catalase - CAT

Alíquotas dos tecidos foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (fosfato-sacarose) e diluídas apropriadamente, quando necessário, no mesmo tampão.

Aos homogeneizados diluídos foram adicionados 20 μL de etanol (95%) para impedir a reversão da atividade da enzima. Para ser feita a solução de peróxido de hidrogênio foi necessária a determinação da concentração exata do estoque. Para isso foi adicionado em uma cubeta de passo óptico de 1cm: 1,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 e realizada uma leitura óptica em 230 nm, chamada de DO_1 . Após essa leitura foi adicionado à mesma cubeta 200 μL da H_2O_2 estoque, diluído 100 vezes, e uma nova leitura óptica foi feita e chamada de DO_2 . O cálculo da concentração se baseou na subtração $\text{DO}_2 - \text{DO}_1$ e multiplicando-se por 141, dado que o ξ da H_2O_2 é 0,071 e o volume final na cubeta era de 2 mL.

A atividade específica da catalase foi então determinada adicionando-se em uma cubeta de passo óptico de 1cm: 100 μL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; 900 μL de H_2O_2 50 mM e água destilada para completar 1950 μL . A mistura foi incubada por 2 minutos com um volume apropriado de homogeneizado, em reação cinética, registrando-se os decréscimos de DO_{230} a cada 10 segundos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos é $\xi_0 = 0,071 / \text{mM.cm}$.

3.6.3 Glutathiona peroxidase - GPx

A atividade específica da glutathiona peroxidase foi determinada através da reação da glutathiona redutase e da oxidação do NADPH, utilizando o hidroperóxido como substrato.

Alíquotas dos tecidos foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (fosfato-sacarose), e em seguida, os homogeneizados foram devidamente diluídos no mesmo tampão. Para a determinação enzimática foram adicionados a cubeta de passo óptico de 1cm: 100 μ L de Tris-EDTA 1 M pH 8,0; 20 μ L GSH 0,1 M; 100 μ L glutathiona redutase 10 U/mL; 100 μ L de NADPH 2 mM; 380 μ L de azida sódica 2,6 μ M; volume apropriado de homogeneizado diluído e um volume de água destilada para completar 970 μ L. Esta amostra foi pré-incubada por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 30 μ L de t-butil hidroperóxido 7 mM.

A oxidação do NADPH foi determinada por 2 minutos com registros de 15 em 15 segundos. O decréscimo da densidade óptica foi determinado contra um branco a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos é $\xi_0 = 6,20 / \text{mM.cm}$.

3.6.4 Glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PDH

A atividade da G6PDH foi determinada através da reação de redução do NADP^+ . Alíquotas dos tecidos foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (fosfato-sacarose).

A atividade específica foi determinada em um ensaio cinético, em cubeta de passo óptico de 1 cm, contendo tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, MgCl_2 0,01 M, NADP^+ 0,2 mM e um volume apropriado de homogeneizado de tecido, para um volume final igual a 950 μ L. A reação ocorreu a partir da adição de 50 μ L de glicose-6-fosfato 0,1 M. A produção de NADPH foi determinada por 2 minutos com registros a cada 10 segundos em 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos é $\xi_0 = 6,20 / \text{mM.cm}$.

3.6.5 Glutathiona-S-transferase - GST

A determinação da atividade específica da GST hepática e plasmática foi feita pelo método de HABIG et al., (1974). O método cinético se baseia na formação do

conjugado da glutathiona com o xenobiótico 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB); reação catalisada pela GST.

Para a determinação da atividade foram adicionados em uma cubeta de 3 mL, volumes adequados de plasma e dos homogeneizados de tecido; 80 μ L de CDNB 50 mM em etanol e uma quantidade de tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 suficiente para completar 1640 μ L. A reação foi pré-incubada por 1 minuto, e 360 μ L de glutathiona reduzida (GSH) 50 mM (preparado em tampão de reação) foram adicionados. O aparecimento do conjugado glutathiona-CDNB foi registrado por 2 minutos a cada 15 segundos em 340 nm. Para cálculo da concentração de produto formado foi utilizado o coeficiente de extinção molar do CDNB $\xi_o = 9,6 / \text{mM.cm}$.

3.7 Determinações Enzimáticas – Transaminases e Fosfatases

Preparação dos homogeneizados de tecido e obtenção do plasma para transaminases (ALAT e ASAT) e fosfatases alcalina e ácida

Os homogeneizados de tecidos foram preparados a partir de alíquotas de fígado em tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7,0 contendo glicerina P.A. (1:1). As amostras foram homogeneizadas em homogeneizador tipo Turrax em banho de gelo, e em baixa velocidade.

Em seguida foram centrifugadas por 3 minutos a 600 x g em 4 °C. Outra centrifugação foi feita por 8 minutos a 6000 x g em 4 °C; e o sobrenadante, contendo uma concentração conhecida de proteínas, foi utilizado para as determinações enzimáticas.

As alíquotas de plasma utilizadas nos ensaios das transaminases, fosfatases e glutathiona-S-transferase, foram obtidas por meio de uma centrifugação do sangue por 3 minutos a 15000 x g em 4 °C.

Transaminases

3.7.1 Alanina aminotransferase (ALAT) - BERGMEYER et al., (1978)

A determinação da atividade específica da alanina aminotransferase foi baseada na reação de transaminação entre alanina e α -cetoglutarato, com a formação de piruvato e sua subsequente redução a lactato através de lactato desidrogenase (LDH) exógena.

A atividade foi estimada em ensaio cinético, em cubeta de passo óptico de 1cm, onde foram adicionados: tampão Tris 100 mM, pH 7,5, contendo alanina (500 mM); 15 µL NADH 10 mM; 20 µL de LDH (100 U); 20 µL de α-cetoglutarato 200 mM; e volume adequado de homogeneizado em um volume final de 1 mL.

O consumo de NADH foi determinado por 2 minutos com registros de 10 em 10 segundos, em 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi $\xi_o = 0,8551 / M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.7.2 Aspartato aminotransferase (ASAT) - BERGMEYER et al., (1978)

A determinação da atividade específica da alanina aminotransferase foi baseada na reação de transaminação entre aspartato e α-cetoglutarato, com a formação de oxaloacetato e sua subsequente redução a malato, através de malato desidrogenase (MDH) exógena.

A atividade foi estimada em ensaio cinético, em cubeta de passo óptico de 1cm, onde foram adicionados: 1990 µL de coquetel preparado em frasco escuro [tampão Tris 80 mM, pH 7,8; aspartato 220 mM; malato desidrogenase (100 U); α-cetoglutarato 200 mM e NADH 10 mM] e volume apropriado de homogeneizado.

O consumo de NADH foi determinado por 2 minutos com registros de 10 em 10 segundos, em 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi $\xi_o = 0,8551 / M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Fosfatases

3.7.3 Fosfatase ácida (FAC) - MOSS *apud* BERGMEYER e BEACH (1983)

A atividade específica da fosfatase ácida foi determinada baseada na reação de hidrólise do p-nitrofenilfosfato, com a formação do produto de cor amarelada p-nitrofenolato.

A reação ocorreu a partir da adição de 2,7 mL de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 5,0; volume adequado de homogeneizado e 100 µL de p-nitrofenilfosfato 0,12 M. A reação foi incubada a 30 °C por 20 minutos, sendo então bloqueada por elevação brusca de pH (400 µL de NaOH 2,0 N). Os tubos foram então, centrifugados a 3000 x g por 2

minutos e o teor de p-nitrofenolato (de cor amarelada) foi registrado em espectrofotômetro em 405 nm contra um branco de reação (que continha p-nitrofenilfosfato e tampão, porém sem homogeneizado). O coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos de atividade enzimática foi $\zeta_{405} = 18.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.7.4 Fosfatase alcalina (FALC) - BRETAUDIÈRE e SPILMAN *apud* BERGMEYER e BEACH (1983)

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada baseada na reação de hidrólise do p-nitrofenilfosfato, com a formação de p-nitrofenolato.

A reação ocorreu a partir da adição de 2,7 mL de tampão glicina 0,05 M, pH 8,5 (contendo MgCl_2 0,01M); volume adequado de homogeneizado e 100 μL de p-nitrofenilfosfato 0,12 M. A reação foi incubada a 30°C por 60 minutos, sendo em seguida bloqueada pela adição de 400 μL de NaOH 2,0 N. Os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 2 minutos e o teor de p-nitrofenolato foi determinado em espectrofotômetro em 405 nm contra um branco de reação (p-nitrofenilfosfato mais o tampão e sem o homogeneizado). O coeficiente de extinção molar utilizado nos cálculos da atividade enzimática foi $\xi_0 = 18200 / \text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.8 Determinação de Antioxidantes Não Enzimáticos

3.8.1 Ácido ascórbico – (CARR et al., 1983)

O conteúdo de ácido ascórbico nos tecidos foi determinado pelo método de condensação com a 2,4 dinitrofenilhidrazina na presença de tiouréia. Foram homogeneizadas, em banho de gelo, alíquotas de tecido em ácido tricloroacético (TCA 20%), e centrifugadas a 12.000 x g por cinco minutos.

A reação foi então realizada pela adição de 250 μL de água destilada, volume adequado de extrato ácido de tecido e 25 μL de 2,6-diclorofenolindofenol (0,2%). Esta mistura reagiu por uma hora em temperatura ambiente e posteriormente foram adicionados 250 μL do reagente contendo tiouréia (0,2%) e ácido metafosfórico (5%), e 250 μL de dinitrofenilhidrazina (0,2% em ácido sulfúrico 12 M). Essa mistura permaneceu por 3 horas a 60 °C. Após este período foram adicionados 500 μL de ácido sulfúrico gelado (18 M) e foi realizada uma centrifugação a 500 x g por 10 minutos. Os

tubos foram então resfriados em gelo e a leitura óptica foi feita contra um padrão de 100 nmols de ácido ascórbico em 524 nm.

3.8.2 Glutathiona reduzida (GSH)

A determinação do conteúdo de glutathiona reduzida nos tecidos foi feita segundo BEUTLER (1984). Este método se baseia na reação entre GSH e DTNB, com a formação de TNB, um produto de cor amarelada.

Alíquotas dos tecidos foram homogeneizadas, em banho de gelo, em tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7. Em seguida os homogeneizados foram centrifugados a 15000 x g por 10 minutos a 4 °C. Aos sobrenadantes obtidos, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (TCA 20%), e realizada uma outra centrifugação a 8000 x g por cinco minutos a 4 °C.

Para a reação foram retirados volumes apropriados de sobrenadante dos extratos ácidos e em seguida foram adicionados a: 400 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8,0; 100 µL de DTNB (ácido 5,5' -ditiobis -2- nitrobenzóico; 2,5 mM), e água destilada em um volume final de reação de 1 mL.

O conteúdo de glutathiona reduzida foi determinado a partir da leitura óptica da formação do ânion tiolato em 412 nm, contra um padrão de 100 nmols de glutathiona.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A determinação da $CL_{(1)50;96h}$ foi feita através do software “Trimmed Spearman-Kärber” “LC50 Programs JSPEAR”, com 95% de confiança (HAMILTON et al. 1977).

Os conjuntos de dados obtidos de atividade enzimática e de conteúdo tecidual dos elementos antioxidantes não enzimáticos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilks. As médias dos grupos: Controle e exposto a deltametrina (96 horas); Controle e recuperação de 10 dias; Controle e recuperação de 20 dias; foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguida por um pós-teste de Tukey, adotando nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS - I

5.1 Experimento de determinação da toxicidade aguda CL₍₁₎50;96h da deltametrina (Keshet®) em juvenis de matrinxã.

O valor estimado da CL₍₁₎50;96h de deltametrina (na formulação comercial Keshet®) para *B. amazonicus* foi de **2,6 µg/L**, com limites superior e inferior de 2,6 e 2,22 µg/L respectivamente. A equação que representa a relação entre concentração e resposta é $y = 20,883x - 9,1681$, com $R^2 = 0,93$.

Não houve mortes no Controle e no tanque com 1,4 µg/L durante todo o experimento. Nos outros tanques expostos a deltametrina foram registradas mortes depois de 24 horas do início da exposição: em 2,4 µg/L ocorreu mortalidade de 50%; em 3,4 µg/L ocorreu mortalidade de 60%; em 4,4 µg/L ocorreu mortalidade de 90%; em 5,4 e 6,4 µg/L ocorreu mortalidade de 100%. Não houve mortes após 48, 72 e 96 horas do início da exposição em nenhuma das concentrações testadas. Estes dados estão resumidos na tabela abaixo:

Tabela 1. Mortalidade de *B. amazonicus* exposto a deltametrina (Keshet®)

Deltametrina (µg/L)	Mortalidade *(%)		
	N inicial	n final (após 96h)	Mortalidade (%)
0	10	10	0
1,4	10	10	0
2,4	10	5	50
3,4	10	4	60
4,4	10	1	90
5,4	10	0	100

*Foram registradas mortes apenas após 24 horas de exposição a deltametrina. Não houve mortes após 48, 72 e 96 horas de exposição em nenhuma das concentrações.

As respostas comportamentais dos animais expostos a deltametrina (Keshet®) também foram registradas. Os peixes do grupo Controle não demonstraram alterações de

comportamento observáveis durante todo o experimento; enquanto que os peixes expostos tiveram algumas alterações de comportamento registradas logo após o início da exposição ao Keshet[®].

Os peixes dos tanques com 2,4; 3,4; 4,4 e 5,4 µg/L de deltametrina apresentaram mudanças de comportamento, tais como: natação errática; batimento opercular acelerado; natação na superfície da água; movimentação circular e perda de equilíbrio na coluna de água; menor atividade natatória e saltos esporádicos para além da superfície da água.

6. DISCUSSÃO - I

6.1 Determinação da toxicidade aguda $CL_{(1)50;96h}$ da deltametrina em juvenis de matrinxã.

A deltametrina está entre os pesticidas mais tóxicos aos peixes. Os efeitos adversos registrados na literatura variam em função da concentração e do tempo de exposição a este inseticida (SENER e SAGLAN, 2005).

As alterações comportamentais observadas dos peixes expostos, em nosso estudo, são similares a outros registros da literatura relacionada, envolvendo exposições agudas de peixes a inseticidas piretróides (tipo II) como deltametrina e cipermetrina: *Poecilia reticulata* (VIRAN et al., 2003); *Heteropneustes fossilis* (SAHA e KAVIRAJ, 2003); *Cyprinus carpio* (SVOBODOVA et al., 2003; CALTA e URAL, 2004); *O. niloticus* (BOATENG et al., 2006); *O. mykiss* (URAL e SAGLAN, 2005; VELISEK et al., 2007). Tais comportamentos podem estar relacionados com a ação neurotóxica da deltametrina, representada pelo bloqueio dos canais de Na^+ e inibição dos receptores GABA dos filamentos nervosos, o que resulta em uma excessiva estimulação do sistema nervoso central, que por sua vez pode levar a uma situação de hipóxia cerebral (GOLOW e GODZI, 1994).

A determinação da $CL_{(1)50;96h}$ é um valor estatístico básico em testes de toxicidade aguda. Assim a determinação da $CL_{(1)50;96h}$ de deltametrina é importante como uma primeira etapa em estudos de riscos ecológicos inerentes ao uso de inseticidas a base desta substância. No nosso estudo o valor estimado da $CL_{(1)50;96h}$ de deltametrina (na formulação comercial Keshet[®]) para matrinxã foi de 2,6 $\mu\text{g/L}$.

A toxicidade aguda da deltametrina, representada pelos valores de $CL_{(1)50;96h}$ é variável entre as diferentes espécies de peixes (GOLOW e GODZI, 1994., SRIVASTAVA et al., 1997). Muitos estudos determinaram diferentes valores de $CL_{(1)50;96h}$ de deltametrina para diferentes espécies de peixes.

O valor encontrado de $CL_{50;96h}$ para *O. mykiss* expostos a deltametrina foi de 0,69 $\mu\text{g/L}$ (SENER et al., 2005). LAKOTA e colaboradores (1989) determinaram a $CL_{50;96h}$ para *C. carpio* igual a 3,5 $\mu\text{g/L}$. GOLOW e GODZI (1994) e BOATENG e colaboradores estimaram a $CL_{50;96h}$ de deltametrina para *O. niloticus* em 15,4 e 14,9

$\mu\text{g/L}$. DATTA e KAVIRAJ (2003) estudando *C. gariepinus* estimaram a $\text{CL}_{50;96\text{h}}$ em $0,004 \mu\text{g/L}$. URAL e SAGLAN (2005) determinaram a $\text{CL}_{50;96\text{h}}$ de deltametrina para truta arco-iris em $0,7 \mu\text{g/L}$, enquanto que SVOBODOVA e colaboradores, (2003) estimaram em $1,45 \mu\text{g/L}$ para carpa comum. Outros valores de $\text{CL}_{50;96\text{h}}$ foram determinados: $0,25 \text{ mg/L}$ para *O. mossabicus* (VIJAYAVEL, 2007); $1,65 \mu\text{g/L}$ para *C. carpio* (CALTA E URAL, 2003).

Estes são apenas alguns dos valores disponíveis na literatura, e quando interpretados em conjunto, revelam a altíssima toxicidade de produtos a base de deltametrina para peixes. Estudos revelaram que a deltametrina presente em ambientes aquáticos pode ser letal para peixes em concentrações de 10 a 1000 vezes menor em relação aos valores de letalidade correspondentes para mamíferos e aves (KÖPRÜCÜ e AYDIN, 2004).

Ainda que os valores de toxicidade aguda, descritos na literatura sejam divergentes, a grande maioria deles está na ordem de microgramas por litro. Isso nos indica que a deltametrina quando presente no ambiente aquático, mesmo em concentrações muito baixas, pode afetar ou até mesmo causar a morte dos peixes. Isto porque, devido ao caráter lipofílico dos piretróides, os peixes podem absorver quantidades muito pequenas de deltametrina pelas brânquias.

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1990), indicam que a $\text{CL}_{(1)50;96\text{h}}$ de deltametrina para peixes, varia entre $0,4$ e $2 \mu\text{g/L}$, sendo portanto, considerada e classificada como extremamente tóxica para estes animais.

Por outro lado, um relatório emitido pela “USDA - National Agricultural Pesticide Impact Assessment Program” estabelece que os valores de $\text{CL}_{(1)50;96\text{h}}$ de deltametrina para peixes, em testes laboratoriais, variam entre 1 e $10 \mu\text{g/L}$.

O valor encontrado de toxicidade aguda da deltametrina (Keshet[®]) para matrinxãs, não coincide com o intervalo de concentração estabelecido pela OMS (1990) e revela que a toxicidade da deltametrina é muito variável, de acordo com a espécie em estudo, com o tempo de exposição e a formulação comercial testada.

A portaria 1.469/2000 do Ministério da Saúde estabelece limite máximo, para a presença de permetrina (piretróide Tipo I) em águas destinadas ao consumo, igual a 20

$\mu\text{g/L}$. Este valor corresponde a aproximadamente 10 vezes mais do que valor encontrado ($2,6 \mu\text{g/L}$), em nosso experimento de toxicidade aguda do Keshet[®] para os matrinxãs.

Isto revela que o ambiente aquático está, de fato, sujeito a concentrações potencialmente letais de piretróides, que porventura venham a ocorrer devido aos mais variados usos destes inseticidas. Ainda, esta portaria regulamenta a presença em águas de permetrina apenas, ficando os outros inseticidas piretróides amplamente comercializados, como deltametrina e cipermetrina, sem uma legislação específica correspondente.

A partir disto, podemos dizer que os riscos de contaminação de ambientes aquáticos por inseticidas a base de deltametrina, devem ser rigorosamente avaliados antes de seu emprego indiscriminado na agricultura, na veterinária, nos programas de controle químico de insetos vetores de doenças e no combate aos parasitos de peixes.

O manuseio correto e a forma de tratamento dos resíduos dos produtos a base de deltametrina são fundamentais no emprego sustentável e seguro dos mesmos. As embalagens dos produtos a base de deltametrina devem seguir procedimentos específicos de coleta e não devem ser dispensados nem lavados no ambiente, principalmente em áreas próximas a corpos de água.

Quanto à legislação vigente, seria recomendado que fossem realizados testes toxicológicos específicos para os diferentes tipos de inseticidas piretróides. Assim a regulamentação da presença de piretróides em águas poderia atender melhor às especificidades de cada piretróide. Com isso, poderiam ser estabelecidos limites de concentração em água mais precisos e condizentes com as respectivas toxicidades de cada um deles.

7. RESULTADOS - II

7.1 Experimento de exposição subletal de juvenis de matrinxã a 0,26 µg/L de deltametrina (Keshet[®])

Não foram registradas mortes durante toda a exposição a 0,26 µg/L (10% CL₍₁₎50;96h), e após os períodos de recuperação, tanto nos tanques do grupo Controle, quanto nos tanques dos peixes expostos.

Os resultados de atividade enzimática específica e os de conteúdo tecidual dos elementos antioxidantes, estão apresentados a seguir, na forma de gráficos de barras, nos quais estão representados, os valores correspondentes às médias e seus respectivos desvios padrão, dos peixes expostos e dos grupos Controle.

7.1.1 Determinações enzimáticas – Enzimas antioxidantes

GLUTATIONA-S-TRANSFERASE – Fígado

A atividade específica da GST hepática dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 47%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Após a recuperação de 10 dias, também verificamos um aumento de atividade de 22% nos peixes expostos. Porém, após 20 dias de recuperação, as médias dos peixes expostos e do respectivo Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 3.

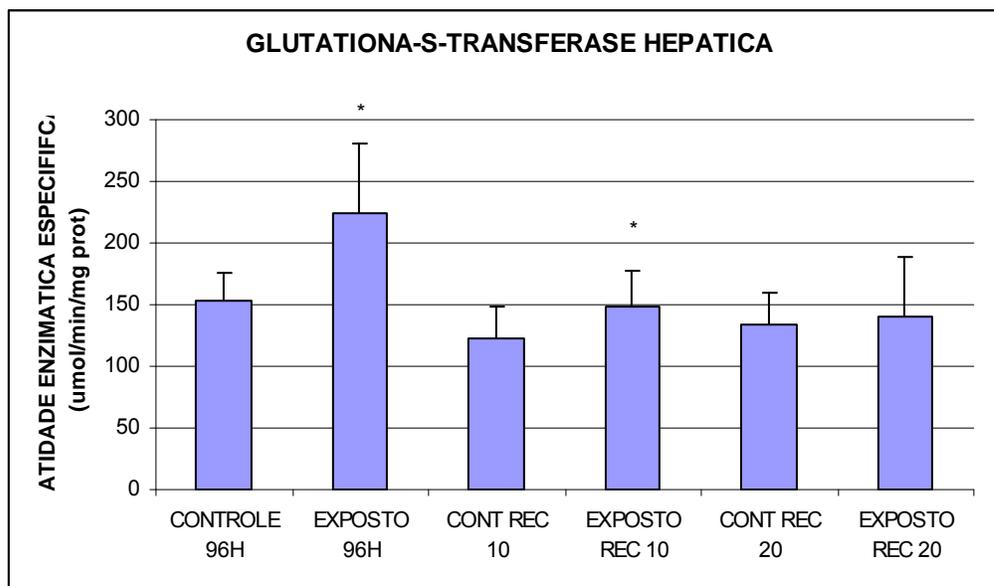


Figura 3. Glutationa-S-Transferase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seus respectivos grupos Controle.

GLUTATIONA-S-TRANSFERASE – Brânquias

A atividade específica da GST branquial não variou estatisticamente entre os peixes expostos ao Keshet[®] e seus respectivos grupos Controle, após 96 horas do início da exposição, nem após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. Os dados estão resumidos na figura 4.

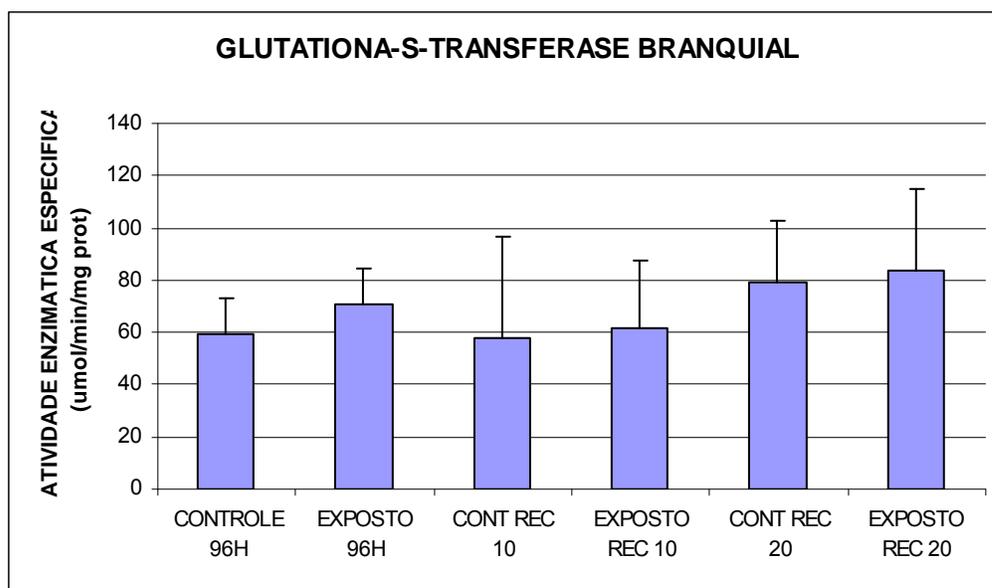


Figura 4. Glutationa-S-Transferase branquial (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.

GLUTATIONA-S-TRANSFERASE – Rim

A atividade específica da GST renal dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 41%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 5.

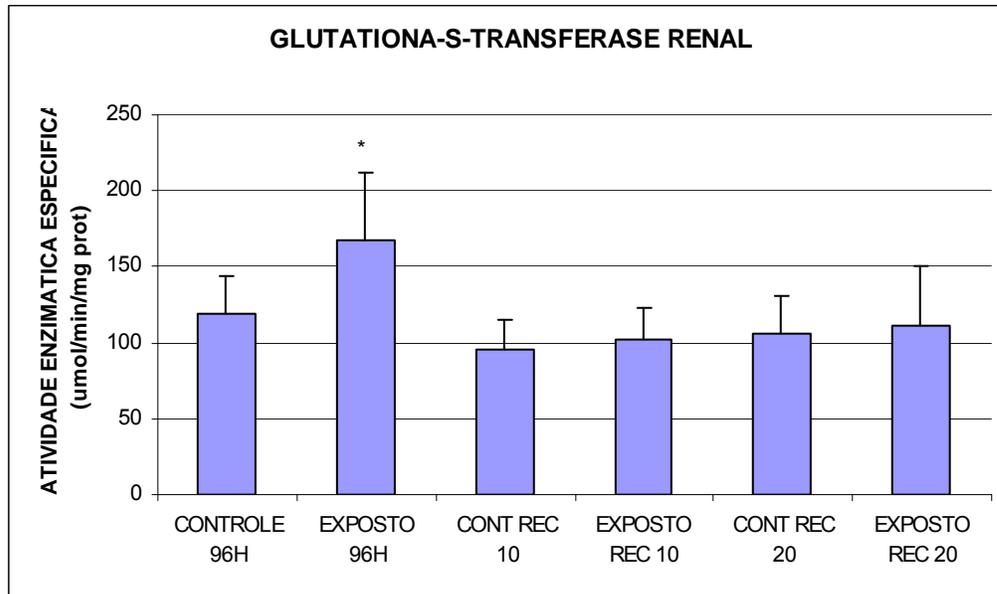


Figura 5. Glutathione-S-Transferase renal (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. O * indica existência de diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e o respectivo grupo Controle.

GLUTATIONA-S-TRANSFERASE – Plasma

A atividade específica da GST plasmática, dos peixes expostos ao Keshet[®], aumentou significativamente em 17% depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Após a recuperação de 10 dias, também verificamos um aumento de atividade de 31% nos peixes expostos. Porém, após 20 dias de recuperação, as médias dos peixes expostos e do respectivo Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 6.

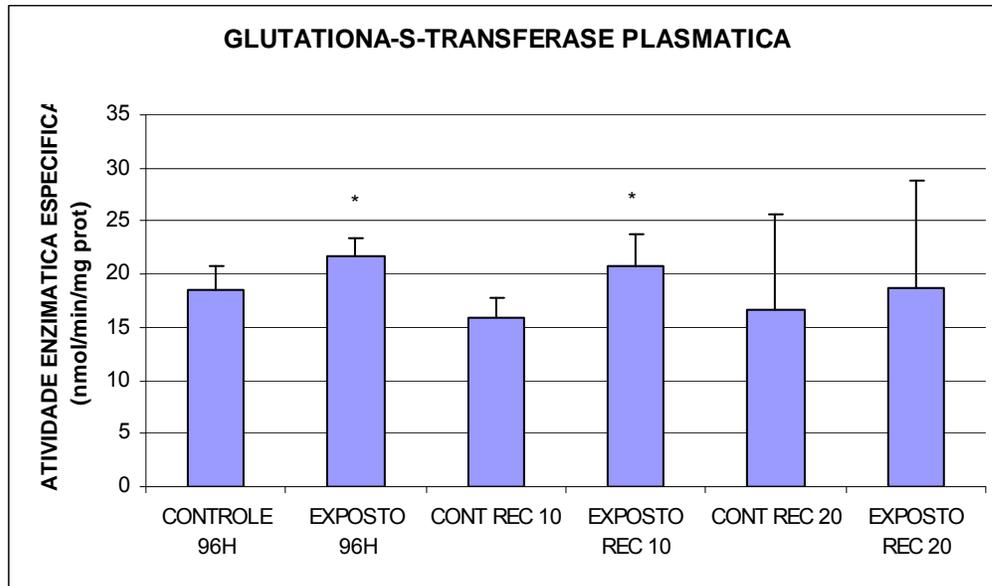


Figura 6. Glutationa-S-Transferase plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seus respectivos grupos Controle.

SUPEROXIDO DISMUTASE – Fígado

A atividade específica da SOD hepática dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 53%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 7.

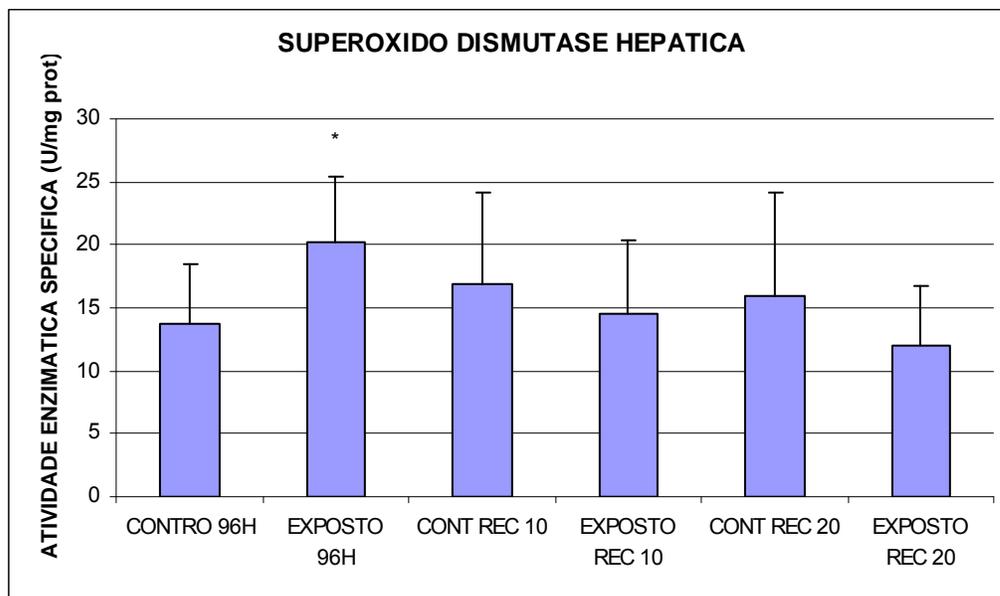


Figura 7. Superóxido dismutase hepática (U/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e o respectivo grupo Controle.

CATALASE – Fígado

A atividade específica da catalase hepática dos peixes expostos ao Keshet[®] diminuiu significativamente em 34%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 8.

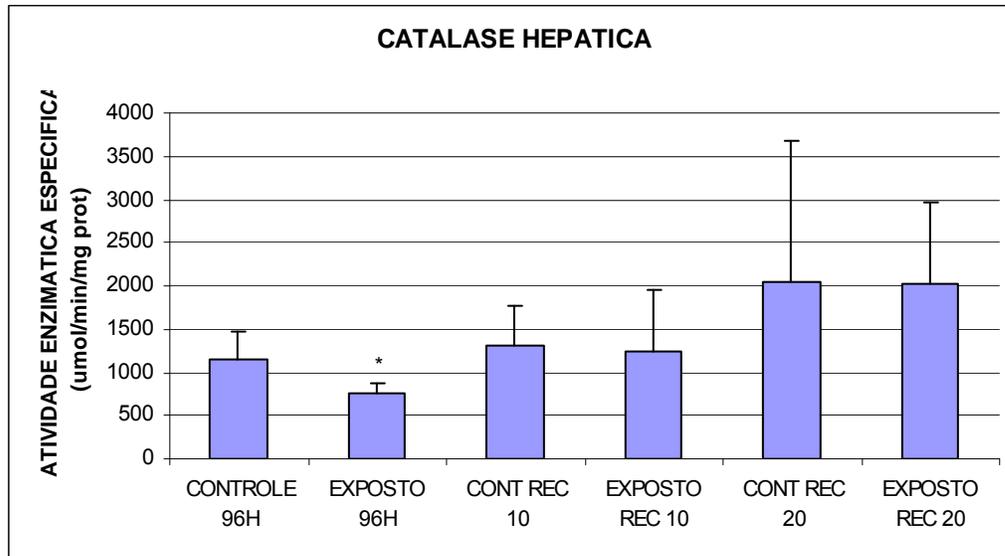


Figura 8. Catalase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e o respectivo grupo Controle.

CATALASE – Brânquias

A atividade específica da catalase branquial dos peixes expostos ao Keshet[®] diminuiu significativamente em 37%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 9.

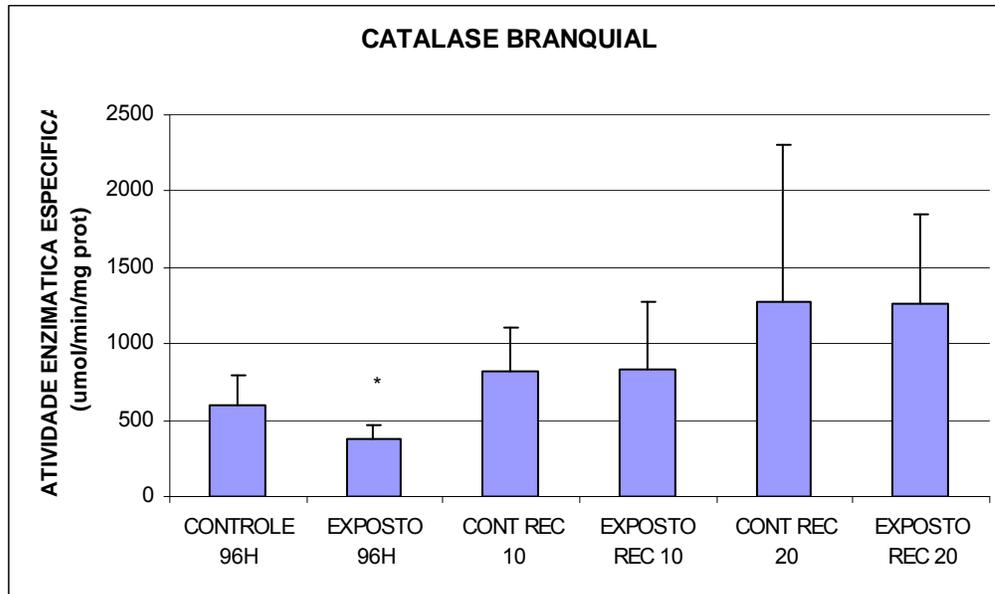


Figura 9. Catalase branquial (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e o respectivo grupo Controle.

CATALASE – Rim

A atividade específica da catalase renal não variou estatisticamente entre os peixes expostos ao Keshet[®] e seus respectivos grupos Controle, após 96 horas do início da exposição, nem após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. Os dados estão resumidos na figura 10.

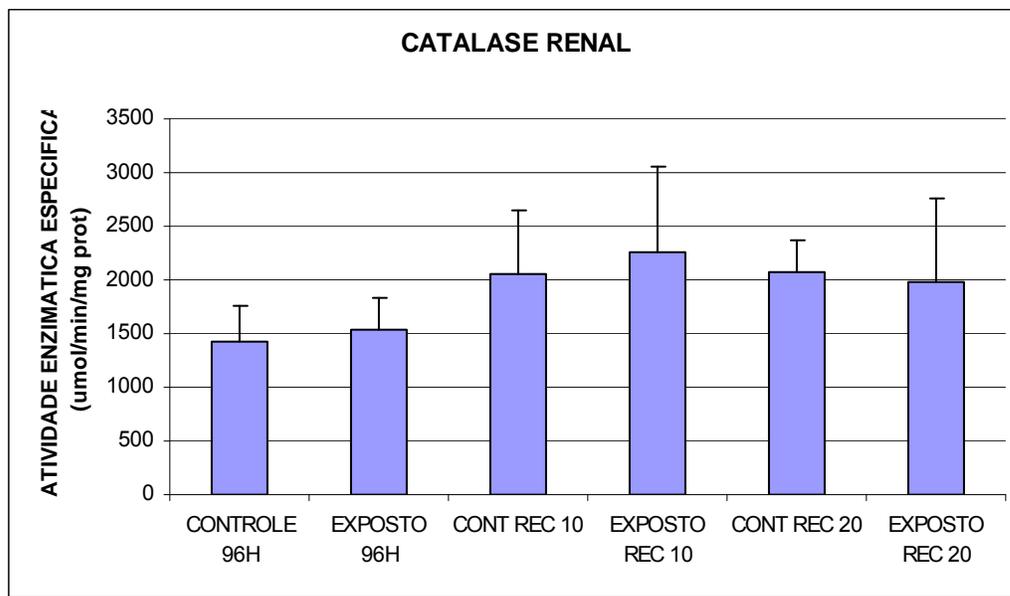


Figura 10. Catalase renal (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.

GLUTATIONA PEROXIDASE – Fígado

A atividade específica da GPx hepática dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 28%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 11.

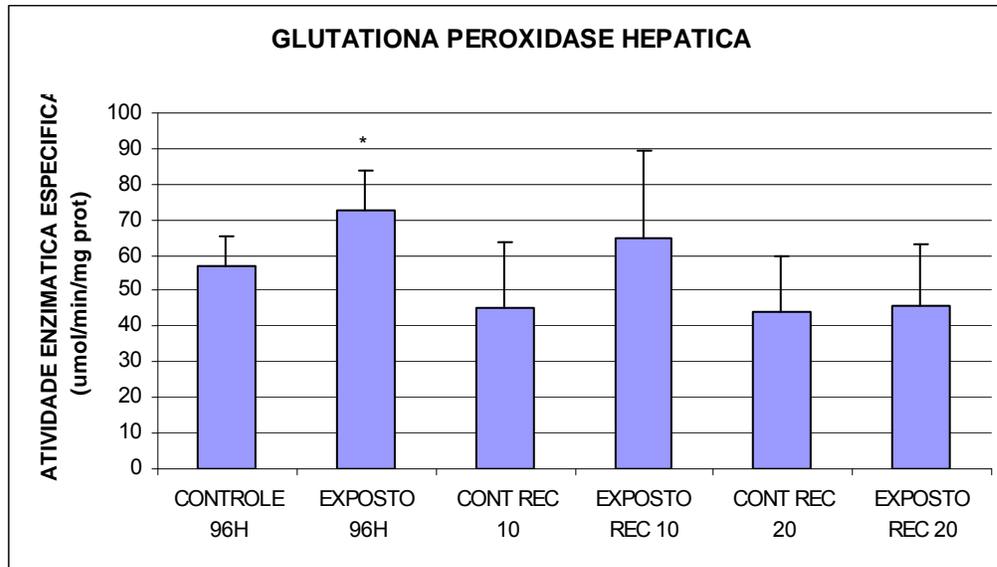


Figura 11. Glutaciona peroxidase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e o respectivo grupo Controle.

GLUTATIONA PEROXIDASE – Brânquias

A atividade específica da GPx branquial dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 61%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 12.

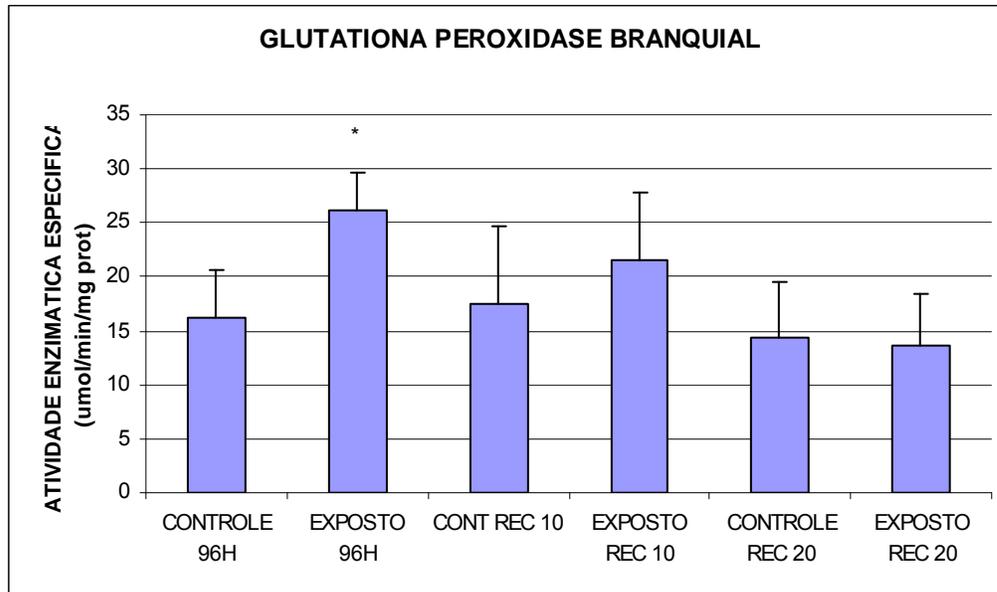


Figura 12. Glutaciona peroxidase branquial (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e o respectivo grupo Controle.

GLUTATIONA PEROXIDASE – Rim

A atividade específica da GPx renal não variou estatisticamente entre os peixes expostos ao Keshet® e seus respectivos grupos Controle, após 96 horas do início da exposição, nem após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. Os dados estão resumidos na figura 13.

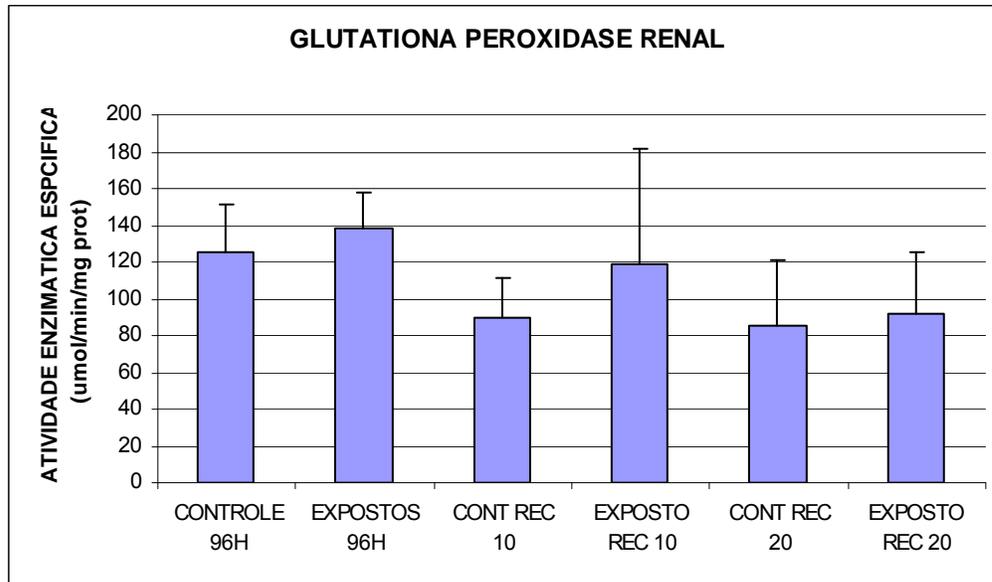


Figura 13. Glutaciona peroxidase renal (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.

GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE - Fígado

A atividade específica da G6PDH hepática dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 39%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 14.

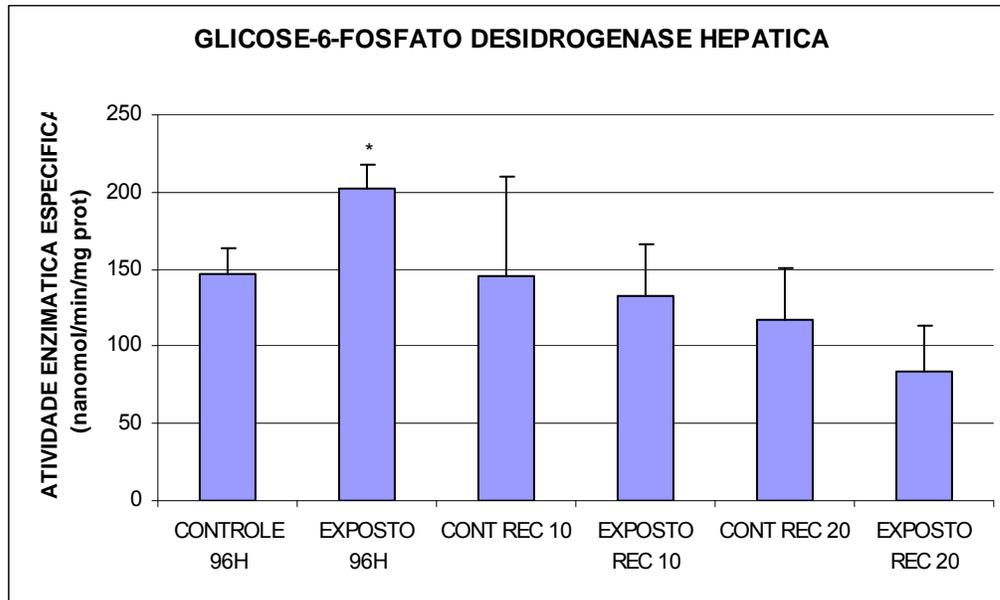


Figura 14. Glicose-6-fosfato desidrogenase hepática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e o respectivo grupo Controle.

GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE – Brânquias

A atividade específica da G6PDH branquial não variou estatisticamente, entre os peixes expostos ao Keshet® e seus respectivos grupos Controle, após 96 horas do início da exposição, nem após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. Os dados estão resumidos na figura 15.

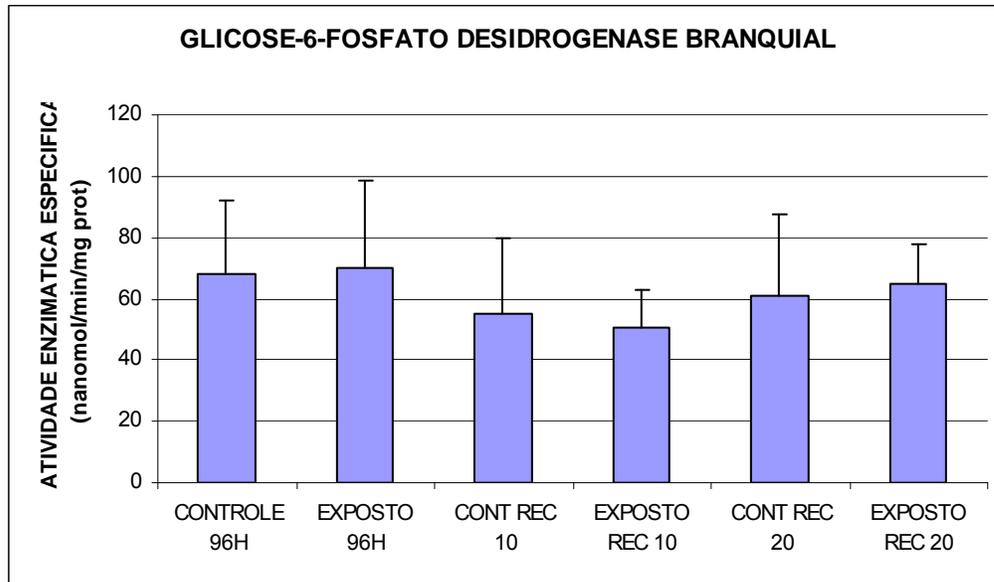


Figura 15. Glicose-6-fosfato desidrogenase branquial (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.

GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE – Rim

A atividade específica da G6PDH renal não variou estatisticamente, entre os peixes expostos ao Keshet[®] e seus respectivos grupos Controle, após 96 horas do início da exposição, nem após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. Os dados estão resumidos na figura 16.

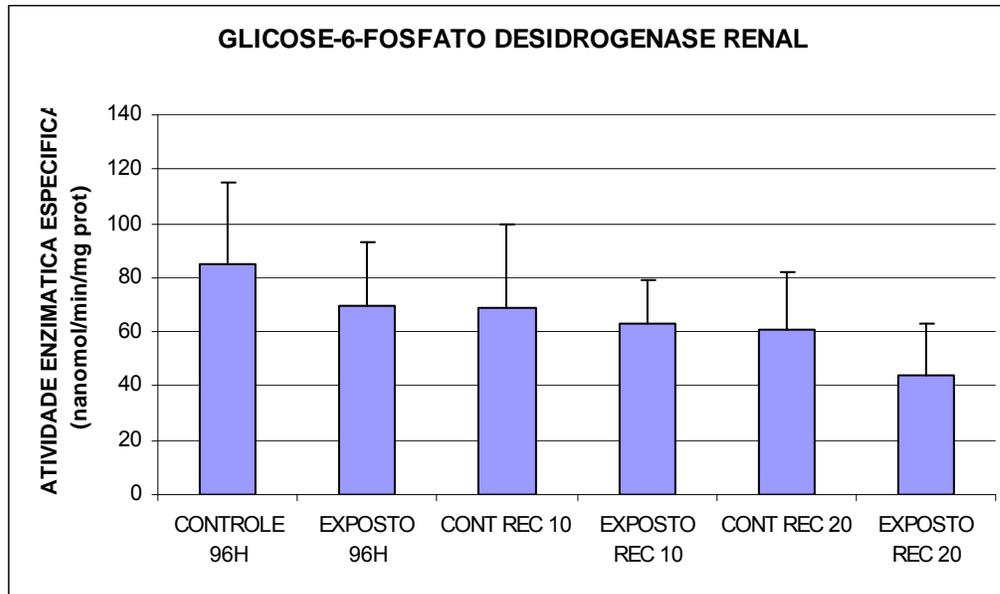


Figura 16. Glicose-6-fosfato desidrogenase renal (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.

7.1.2 Determinações Enzimáticas – Transaminases

ALANINA AMINOTRANSFERASE – Fígado

A atividade específica da ALAT hepática não variou estatisticamente, entre os peixes expostos ao Keshet[®] e o respectivo grupo Controle, depois de 96 horas transcorridas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, ocorreram aumentos de 12 e 8%, respectivamente, na atividade da ALAT hepática dos peixes expostos ao Keshet[®], quando comparados com seus respectivos grupos Controle. Os dados estão resumidos na figura 17.

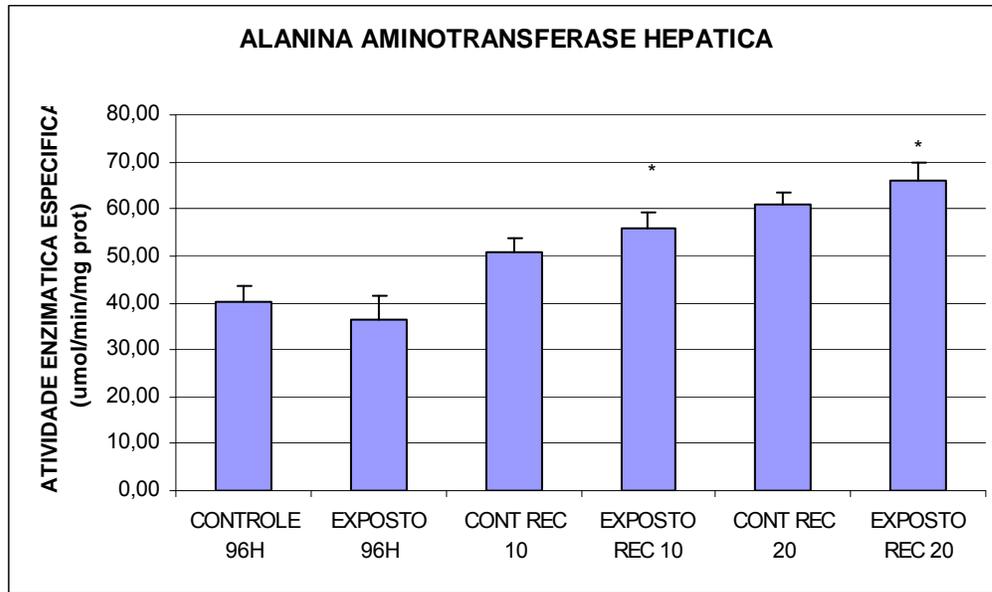


Figura 17. Alanina aminotransferase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica existência de diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seus respectivos grupos Controle.

ALANINA AMINOTRANSFERASE – Plasma

A atividade específica da ALAT plasmática dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 21%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 18.

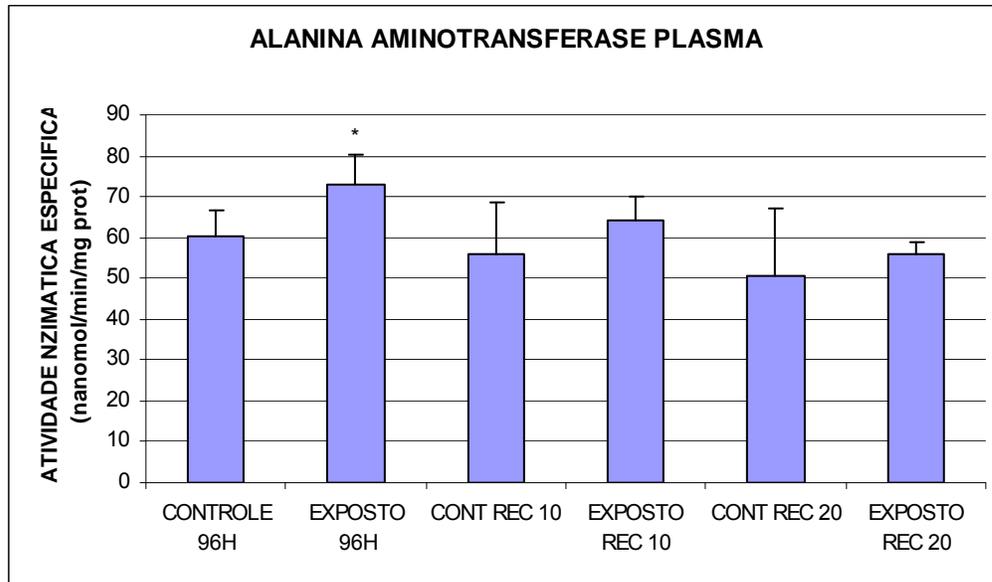


Figura 18. Alanina aminotransferase plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seus respectivos grupos Controle.

ASPARTATO AMINOTRANSFERASE – Fígado

A atividade específica da ASAT hepática não variou estatisticamente, entre os peixes expostos ao Keshet[®] e os respectivos grupos Controle, após 96 horas transcorridas do início da exposição, nem após a recuperação de 20 dias. Porém, após a recuperação de 10 dias, foi registrado um aumento de 14% na atividade da ALAT hepática dos peixes expostos ao Keshet[®], quando comparados com o respectivo grupo Controle. Os dados estão resumidos na figura 19.

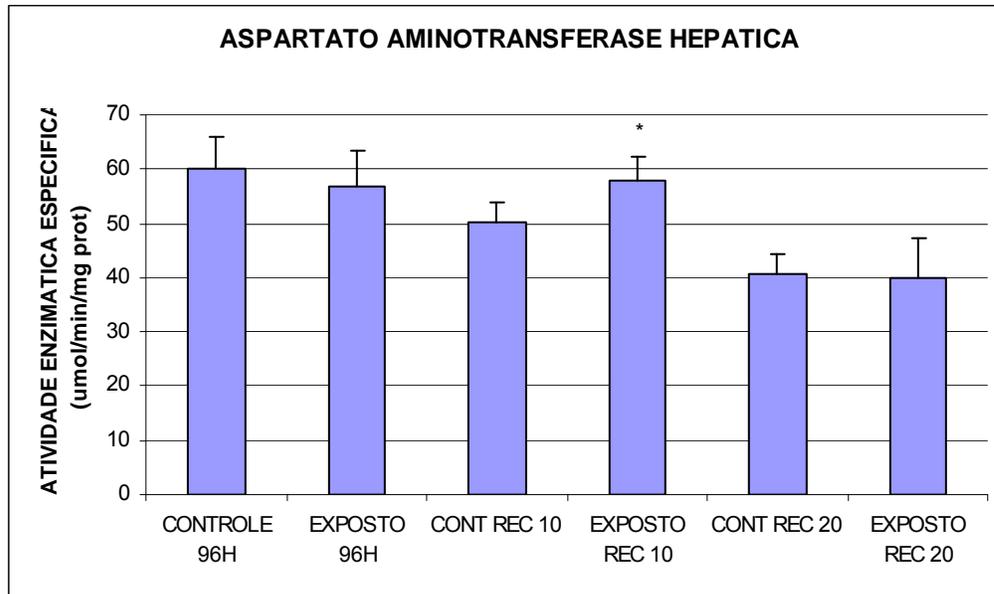


Figura 19. Aspartato aminotransferase hepática (umol/min/mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seu respectivo grupo Controle.

ASPARTATO AMINOTRANSFERASE – Plasma

A atividade específica da ASAT plasmática dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 16%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 20.

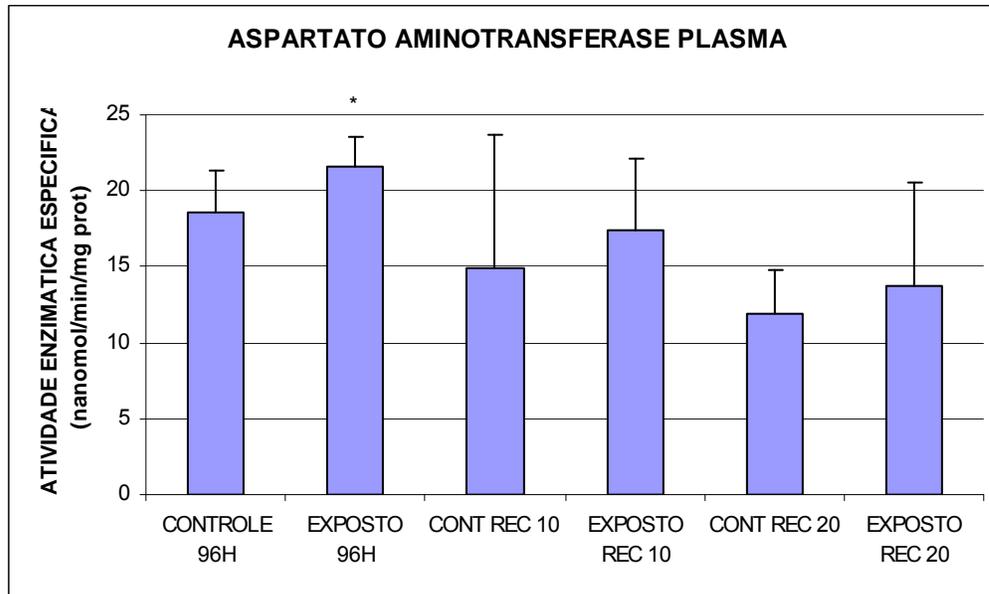


Figura 20. Aspartato aminotransferase plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seu respectivo grupo Controle.

7.1.3 Determinações Enzimáticas – Fosfatases

FOSFATASE ALCALINA – Fígado

A atividade específica da FALC hepática não variou estatisticamente, entre os peixes expostos ao Keshet[®] e o respectivo grupo Controle, após 96 horas transcorridas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, ocorreram aumentos de 17 e 31%, respectivamente, na atividade da FALC hepática dos peixes expostos ao Keshet[®], quando comparados com seus respectivos grupos Controle. Os dados estão resumidos na figura 21.

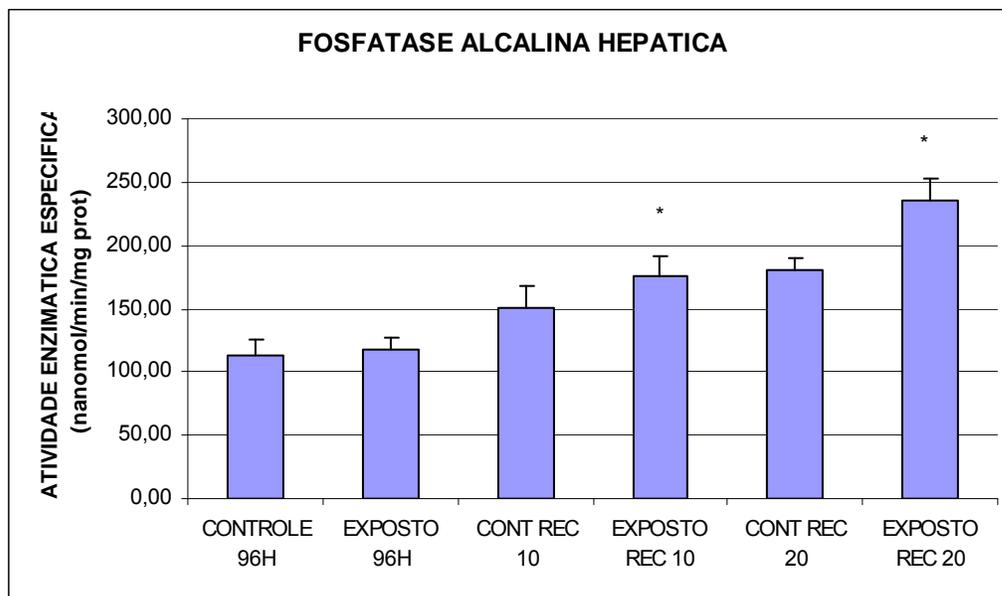


Figura 21. Fosfatase alcalina hepática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seus respectivos grupos Controle.

FOSFATASE ALCALINA – Plasma

A atividade específica da FALC plasmática não variou estatisticamente, entre os peixes expostos ao Keshet[®] e o respectivo grupo Controle, após 96 horas transcorridas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, ocorreram aumentos de 28 e 26%, respectivamente, na atividade da FALC hepática dos peixes expostos ao Keshet[®], quando comparados com seus respectivos grupos Controle. Os dados estão resumidos na figura 22.

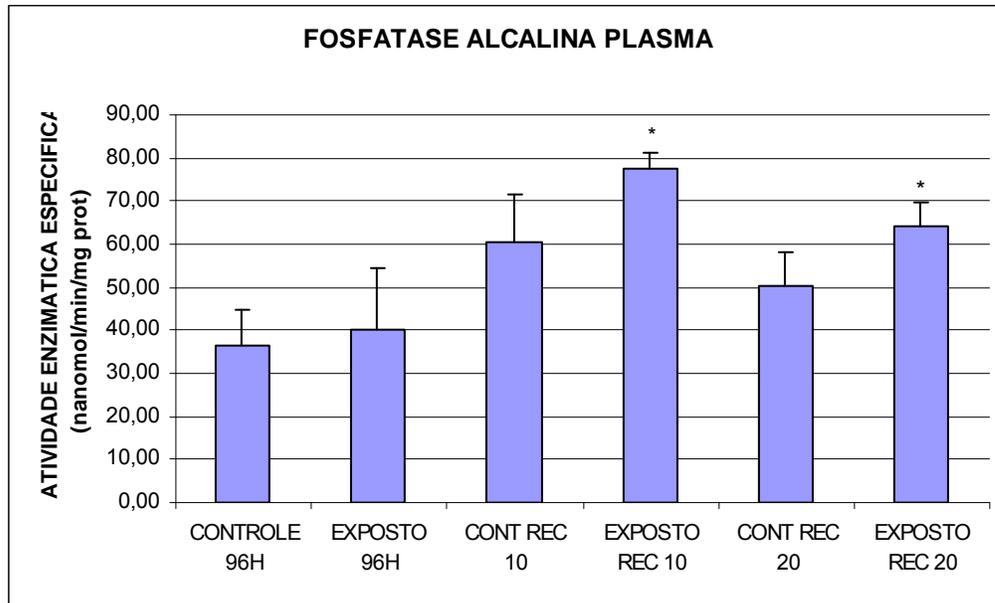


Figura 22. Fosfatase alcalina plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seus respectivos grupos Controle.

FOSFATASE ÁCIDA – Fígado

A atividade específica da fosfatase ácida hepática não variou estatisticamente entre os peixes expostos ao Keshet[®] e seus respectivos grupos Controle, após 96 horas do início da exposição, nem após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. Os dados estão resumidos na figura 23.

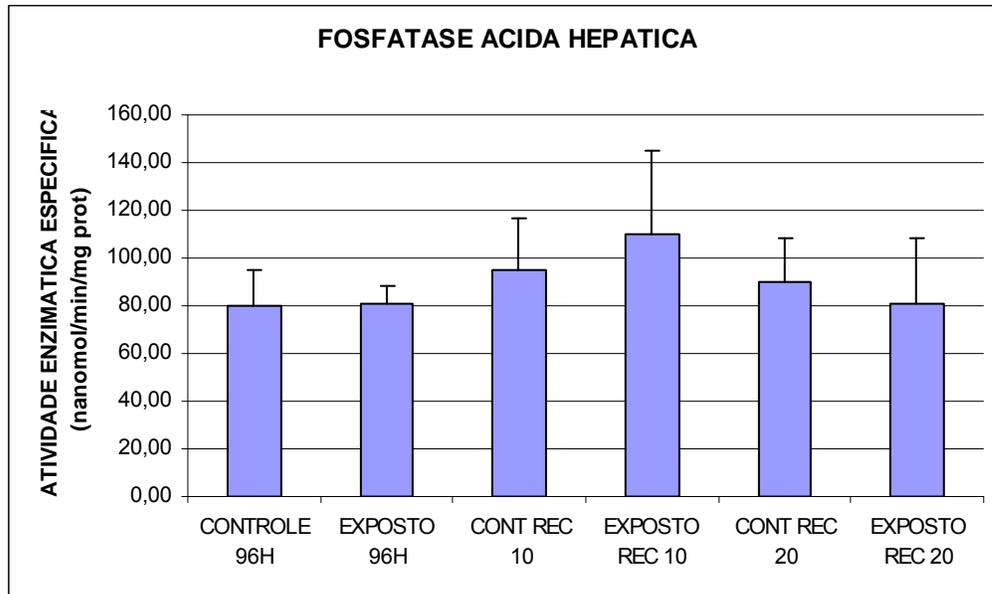


Figura 23. Fosfatase ácida hepática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.

FOSFATASE ÁCIDA – Plasma

A atividade específica da fosfatase ácida plasmática não variou estatisticamente entre os peixes expostos ao Keshet[®] e seus respectivos grupos Controle, após 96 horas do início da exposição, nem após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. Os dados estão resumidos na figura 24.

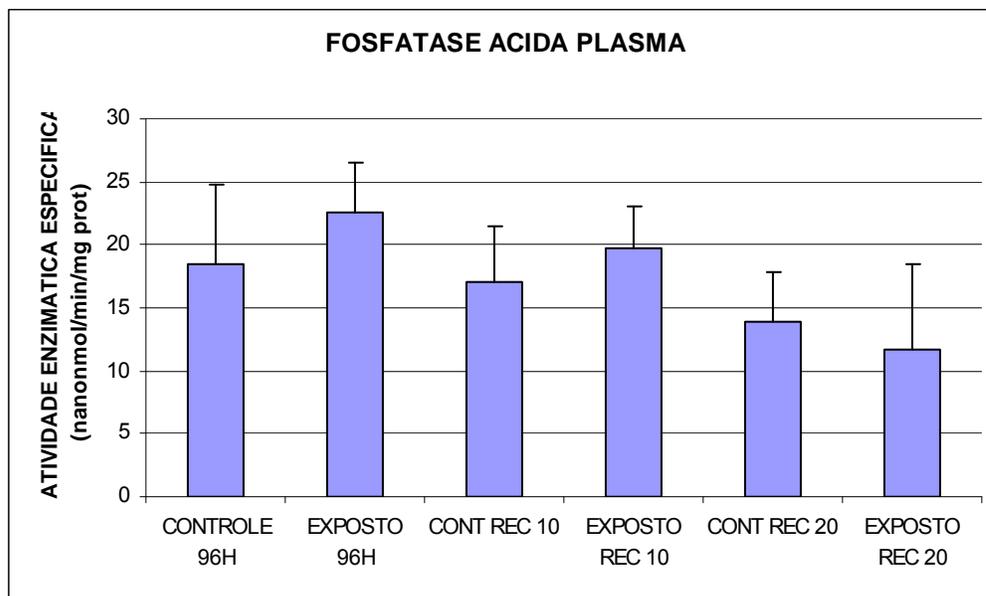


Figura 24. Fosfatase ácida plasmática (nanomol/min/mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias.

7.1.4 Quantificação de Antioxidantes Não Enzimáticos

ÁCIDO ASCORBICO – Fígado

A concentração do conteúdo hepático de ácido ascórbico dos peixes expostos ao Keshet[®] diminuiu significativamente em 23%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 25.

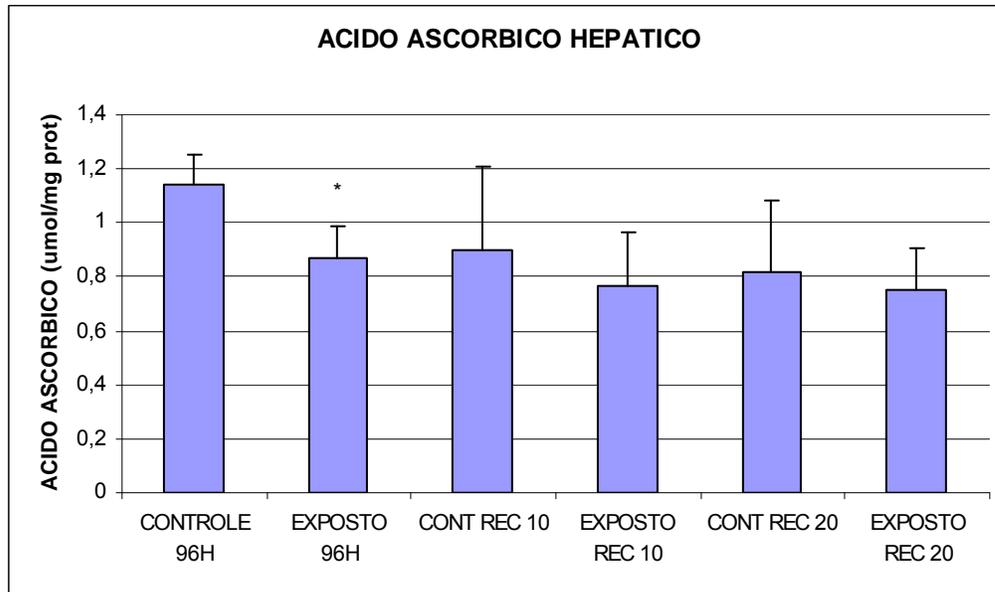


Figura 25. Ácido ascórbico hepático (umol/ mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seu respectivo grupo Controle.

ÁCIDO ASCORBICO – Rim

A concentração do conteúdo renal de ácido ascórbico dos peixes expostos ao Keshet[®] diminuiu significativamente em 38%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 26.

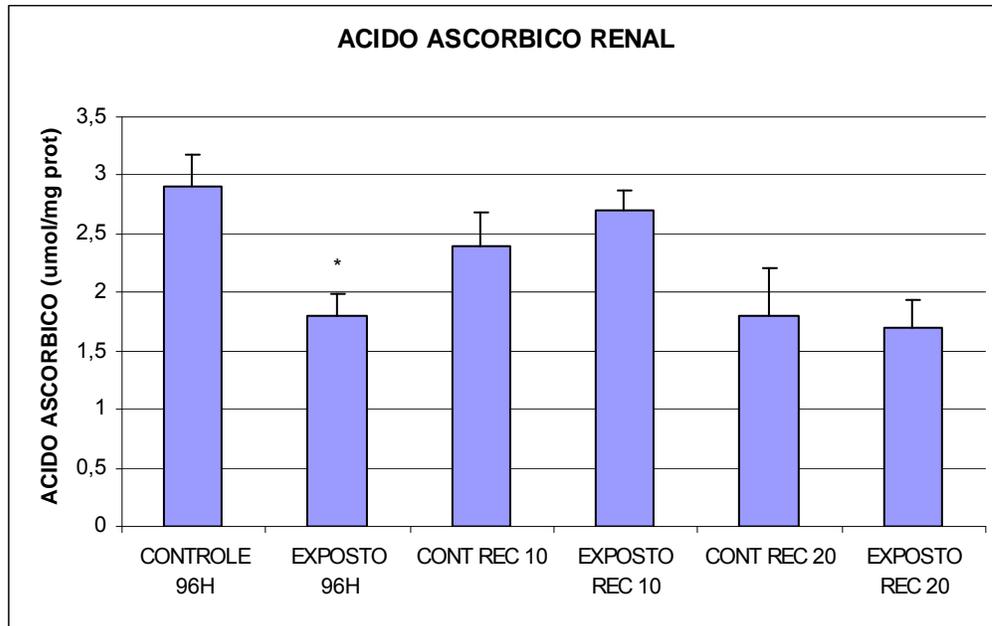


Figura 26. Ácido ascórbico renal (umol/ mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica existência de diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seu respectivo grupo Controle.

GLUTATIONA REDUZIDA – Fígado

A concentração do conteúdo hepático de GSH dos peixes expostos ao Keshet[®] aumentou significativamente em 76%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Após o período de recuperação de 10 dias ocorreu um aumento de 15% nos peixes expostos. Porém, após a recuperação de 20 dias, as médias dos peixes expostos e do respectivo grupo Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 27.

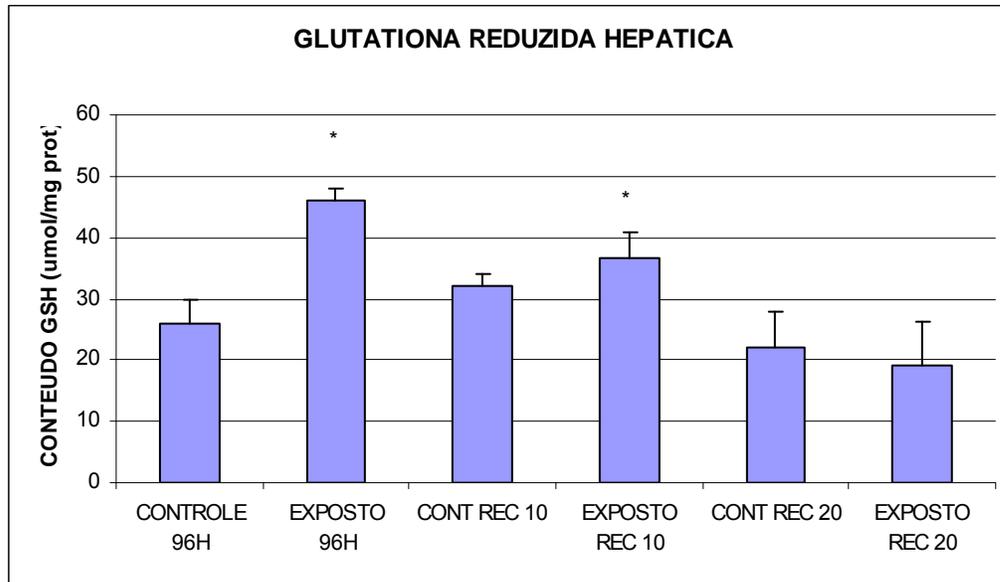


Figura 27. Glutathiona reduzida hepática (umol/ mg prot) de matrinxãs expostas a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seus respectivos grupos Controle.

GLUTATIONA REDUZIDA – Brânquias

A concentração do conteúdo branquial de GSH dos peixes expostos ao Keshet[®] diminuiu significativamente em 36,5%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 28.

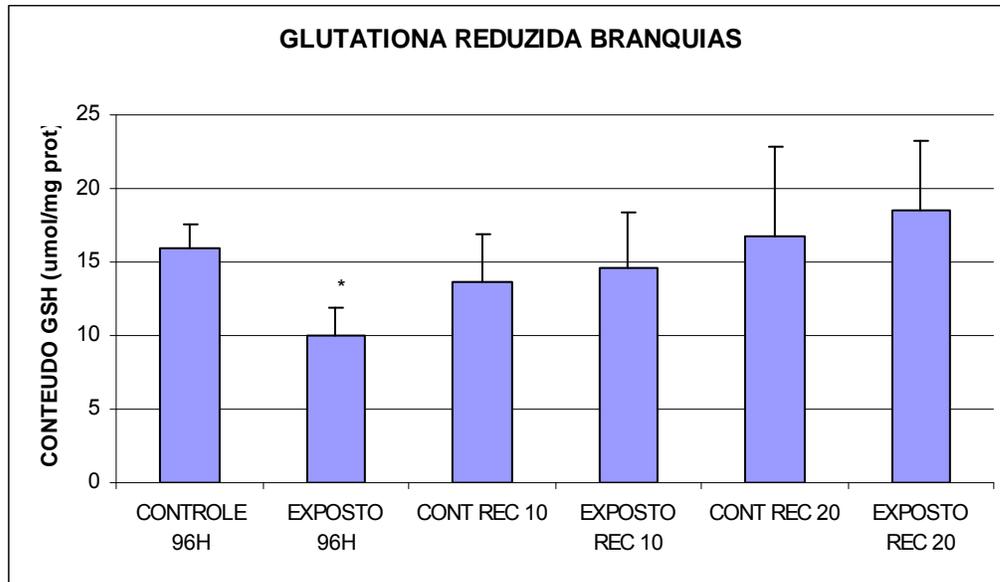


Figura 28. Glutationa reduzida branquial (umol/ mg prot) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seu respectivo grupo Controle.

GLUTATIONA REDUZIDA – Rim

A concentração do conteúdo renal de GSH dos peixes expostos ao Keshet[®] diminuiu significativamente em 22%, depois de transcorridas 96 horas do início da exposição. Porém, após as recuperações de 10 e 20 dias, as médias dos peixes expostos e dos respectivos grupos Controle não foram estatisticamente diferentes. Os dados estão resumidos na figura 29.

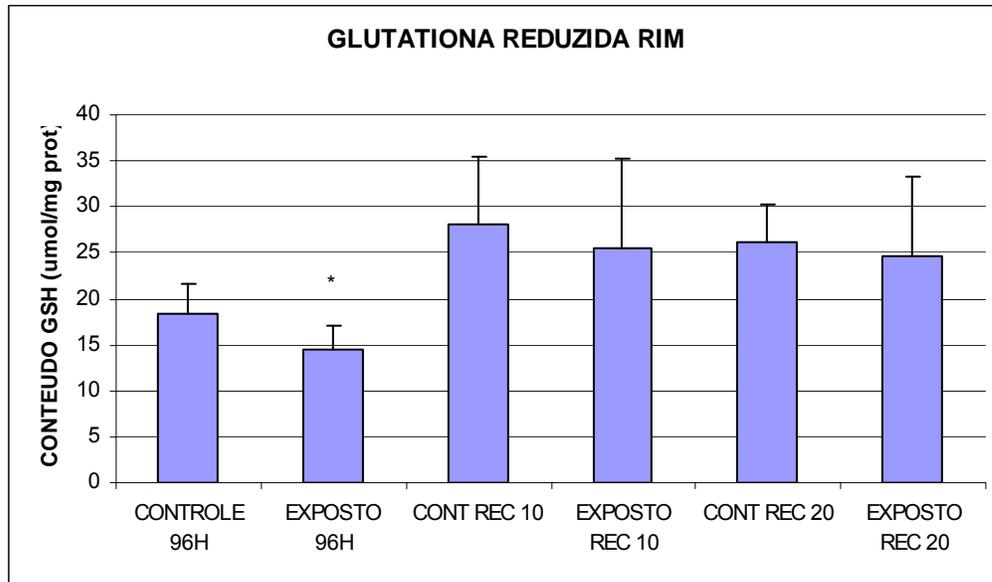


Figura 29. Glutationa reduzida renal ($\mu\text{mol/ mg prot}$) de matrinxãs expostos a deltametrina (96h) e após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. (*) indica diferença significativa, com $p < 0,05$, entre os peixes expostos e seu respectivo grupo Controle.

8. DISCUSSÃO - II

8.1 Experimento de exposição subletal de juvenis de matrinxã a 0,26 µg/L de deltametrina (Keshet®)

8.1.1 Sistema de defesa antioxidante e Estresse oxidativo

Xenobióticos são importantes fontes de ERO nos sistemas biológicos. Em concentrações fisiológicas, tais moléculas são essenciais na manutenção da homeostasia, uma vez que respondem pela sinalização intracelular, pela inflamação e pela defesa contra microorganismos invasores (DROGE, 2002). Porém a exposição dos organismos a poluentes químicos pode levar a um desbalanco celular entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes, com o predomínio destes últimos (SIES, 1991). Tal situação pode dar início ao estresse oxidativo nos sistemas biológicos, representado por peroxidação de lipídeos insaturados das membranas celulares; danos a proteínas e DNA, que podem levar a alteração da expressão gênica; e alterações nas atividades de enzimas antioxidantes, receptores e transportadores de membrana. Todos estes processos, quando não reparados ou evitados, alteram a funcionalidade das células, tecidos e órgãos, e podem culminar em danos irreparáveis que podem levar o organismo à morte (PRADHAM et al., 1990; KOTKAT et al., 1999; SALVI et al., 2001; VALAVANIDIS, 2006).

Organismos aeróbicos desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, mecanismos de defesa antioxidante que têm como função primária prevenir a célula de danos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) (VALAVANIDIS et al., 2006).

Os organismos têm a habilidade de sintetizar e controlar sistemas enzimáticos específicos que podem atuar no reparo e na remoção de proteínas, lipídeos e DNA danificados (FENECH & FERGUSON, 2001).

A interação entre espécies reativas de oxigênio e a defesa antioxidante nos organismos aeróbicos se dá por meio de uma série de enzimas antioxidantes e de substâncias de baixo peso molecular (os antioxidantes não enzimáticos), cujos papéis são interceptar e inativar estas moléculas reativas (DAVIES, 1995; VALAVANIDIS et al., 2006). Desta forma os componentes do sistema antioxidante atuam em conjunto e de forma complementar, neutralizando diferentes tipos de espécies reativas e seus produtos dentro e fora da célula (NORDBERG e ARNER, 2001). Ainda, considerando que os níveis de estresse oxidativo podem variar conforme o tempo, os organismos são capazes

de lidar com tais variações na medida em que podem induzir a síntese adicional dos elementos enzimáticos e não enzimáticos da defesa antioxidante para prevenir ou reparar danos causados pela oxidação resultante das ERO (YOUNG & WOODSIDE, 2001; MARTINS et al., 1991).

A indução de estresse oxidativo e os danos oxidativos resultantes em biomoléculas fundamentais, bem como alterações no sistema de defesa antioxidante dos organismos constituem um campo de estudo bem estabelecido na toxicologia ambiental (KELLY et al., 1998; REGOLI et al., 2002). O ensaio das enzimas antioxidantes e das moléculas antioxidantes não enzimáticas pode oferecer indicações do status antioxidante dos organismos e servir como biomarcadores de estresse oxidativo (VALAVANIDIS et al., 2006). A busca de biomarcadores justifica-se pelo fato de que esses permitem detectar uma contaminação ambiental, avaliar sua magnitude, e identificar espécies ou populações em risco de contaminação (STEGEMAN et al., 1992).

Estudos sobre estresse oxidativo induzido por xenobióticos e seus efeitos nos vários elementos antioxidantes dos peixes têm proporcionado informações úteis a respeito das conseqüências ecotoxicológicas do uso de inseticidas à base de deltametrina (AHMAD et al., 2000).

8.1.2 Enzimas antioxidantes

Em nosso estudo os matrinxãs expostos à concentração subletal de deltametrina, na formulação comercial Keshet[®], sofreram alterações nas atividades biológicas dos elementos antioxidantes enzimáticos, e no conteúdo tecidual dos elementos antioxidantes não enzimáticos, quando comparados com matrinxãs não expostos (grupos Controle).

A avaliação da atividade enzimática da glutathione-S-transferase (GST) e de outras enzimas da fase II da biotransformação vem ganhando credibilidade na busca de biomarcadores de exposição à xenobióticos em programas de biomonitoramento de poluição aquática (LIVINGSTONE, 1998; PAYNE et al., 1987; RODRIGUEZ-ARIZA et al., 1991). As GST desempenham papel fundamental no processo de desintoxicação, pois catalisam a conjugação de GSH com o xenobiótico, facilitando a sua excreção.

Muitos estudos envolvendo a avaliação da GST revelaram alterações de atividade desta enzima em peixes expostos a diferentes inseticidas.

SAYEED e colaboradores, (2003) demonstraram que exemplares de *Channa punctatus* expostos por 48 horas a deltametrina, apresentaram um aumento na atividade da GST no fígado e no rim, enquanto que nas brânquias ocorreu uma redução de atividade da mesma. Por outro lado, PIMPAO e colaboradores, (2006) demonstraram que juvenis de *Ancistrus multispinis* expostos a deltametrina sofreram redução de atividade da GST nas brânquias. AHMAD e colaboradores (2000) registraram aumento de atividade da GST hepática em *C. punctatus* expostos a efluente industrial.

Em nosso estudo os matrinxãs expostos a deltametrina, na formulação Keshet[®], apresentaram aumentos de atividade enzimática da GST hepática de 47% e 22% depois de transcorridas 96 horas do início da exposição, e após o período de recuperação de 10 dias, respectivamente. Tais aumentos no fígado foram concomitantes ao aumento do conteúdo hepático de glutathione reduzida (GSH). No rim a atividade da GST também foi aumentada, porém depois de 96 horas apenas. Tal aumento no rim foi acompanhado por uma diminuição no conteúdo de GSH renal, o qual parece ter sido suficiente para suprir a demanda da GST, não havendo, portanto, necessidade de síntese adicional. Nas brânquias a GST não apresentou alterações de atividade durante toda a exposição, nem após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. No plasma verificamos um aumento de atividade da GST após 96 horas e após a recuperação de 10 dias.

Tais resultados são geralmente esperados, uma vez que as GST (enzimas da fase II da biotransformação) desempenham um importante papel na desintoxicação e eliminação de compostos xenobióticos. Aumentos de atividade da GST dos peixes expostos parecem proporcionar proteção celular contra a toxicidade do inseticida. Ainda, o fígado e o rim parecem ser locais importantes de biotransformação nos peixes, enquanto que as brânquias, apesar de serem o local de entrada do xenobiótico, não revelaram alterações significativas.

Superóxido dismutases (SOD) são enzimas que retiram o radical superóxido (O_2^-) resultando na formação de H_2O_2 . CANADA e CALABRESE (1989) propuseram que a atividade da SOD pode aumentar ou diminuir após exposição de mamíferos a vários xenobióticos. Similarmente em peixes, a atividade da SOD pode aumentar depois de exposições a organoclorados (ROBERT et al., 1987) e hidrocarbonetos (LIVINGSTONE, 1993). YOUSEF e colaboradores, (2006) trabalhando com ratos tratados com

deltametrina, observaram uma redução de atividade da SOD plasmática, e propuseram então que ela desempenha função importante no processo de defesa antioxidante, na medida em que retiram os radicais superóxido presentes na célula.

Em nosso estudo os matrinxãs expostos a deltametrina apresentaram um aumento de atividade da SOD citosólica hepática depois de 96 horas transcorridas do início da exposição. Tal aumento pode ser uma indicação de que os matrinxãs expostos ao inseticida tiveram aumentos na concentração celular de radicais livres, tais como o ânion superóxido. Sabe-se que concentrações elevadas de radicais livres estão associadas a diversas doenças, pois podem deflagrá-las ou intensificá-las.

Como visto, a reação catalisada pela SOD gera H_2O_2 na célula. A partir dos dados registrados de aumento de atividade da SOD dos matrinxãs expostos, é plausível supor que houve aumento na concentração de peróxido de hidrogênio na célula. A presença de H_2O_2 pode levar ao aparecimento do radical altamente reativo $OH\cdot$ (via reação Haber-Weiss), que pode causar sérios danos ao DNA, enzimas e membranas. Assim é importante que haja reações que removam o excedente de H_2O_2 celular. Para tanto existem duas enzimas principais que realizam esta função de retirada de H_2O_2 : catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx).

A avaliação da atividade biológica das enzimas CAT e GPx, como busca de biomarcadores de exposição a xenobióticos também vem ganhando credibilidade no monitoramento de poluição aquática (ALMEIDA et al., 2005). SAYEED e colaboradores, (2003) demonstraram que exemplares de *Channa punctatus* expostos por 48 horas a deltametrina, apresentaram redução da atividade da catalase (CAT) da ordem de 45%, 43%, 33%, no fígado, rim e brânquias, respectivamente. Neste mesmo estudo eles verificaram um aumento na atividade da glutaciona peroxidase (GPx) no fígado e no rim, enquanto que nas brânquias ocorreu uma redução de atividade da mesma. ZHANG e colaboradores. (2004) mostraram aumentos de atividade hepática da CAT, GPx e SOD, em peixe-ouro, induzidos por exposição crônica ao 2,4 diclorofenol.

A catalase é uma enzima tetramérica, na qual cada subunidade apresenta 60kDa, com um grupo heme por tetrâmero (KIRKMAN & GAETANI, 1984). Ela está presente majoritariamente dentro dos peroxissomos, devido ao grande número de enzimas oxidases (produtoras de H_2O_2) presentes nestas organelas (KELLY et al., 1998).

Em nosso estudo os matrinxãs expostos a deltametrina apresentaram uma diminuição de atividade da CAT hepática e branquial após 96 horas, quando comparados com os peixes do respectivo grupo Controle. Porém, esta enzima não se alterou no rim durante toda a exposição, nem após as recuperações de 10 e 20 dias. Resultados similares foram obtidos por PANDEY e colaboradores (2001), que demonstraram que a exposição ao endossulfan resultou em diminuição da atividade da CAT, e em aumento de atividade das outras enzimas antioxidantes, como a GPx.

A inibição da atividade da CAT hepática e branquial pode ser creditada a um possível aumento na concentração de radicais superóxido na célula, uma vez que foi demonstrado que tais radicais são capazes de inibir esta enzima e também a glutathione peroxidase (GPx) (KONO & FRIDOVICH, 1982). A hipótese de aumento de superóxidos na célula, em nosso estudo, é apoiada pelo aumento de atividade observado da SOD hepática.

Uma outra enzima responsável pela retirada de H_2O_2 da célula é a glutathione peroxidase. Esta enzima é encontrada no citosol e catalisa a reação de redução de peróxidos orgânicos (ROOH), visto que estes são produtores de radicais livres. A glutathione reduzida (GSH) fornece os equivalentes de redução necessários a esta reação. A glutathione peroxidase, portanto, depende da renovação de glutathione reduzida no meio. A enzima glutathione redutase é a responsável pela manutenção do teor de glutathione reduzida (antioxidante não enzimático), sendo o NADPH o doador de elétrons.

Aumentos de atividade da glutathione peroxidase são reportados na literatura como sendo resultado da indução causada por poluentes químicos (RAD et al., 1985). Peixes suscetíveis a danos causados por oxidações, geralmente apresentam atividade da GPx aumentada (AKSNES & NJAA, 1981).

Em nosso estudo os matrinxãs expostos a deltametrina apresentaram aumento de atividade da GPx hepática e branquial depois de 96 horas transcorridas do início da exposição. Porém a atividade da GPx no rim não se alterou durante todo o experimento. A atividade aumentada da GPx pode ser uma consequência do maior influxo de H_2O_2 , provavelmente produzido nas reações catalisadas pela SOD. A importância da GPx, de modo geral, reside no fato de esta enzima ser uma alternativa importante para manter níveis baixos de H_2O_2 na célula, uma vez que pouca quantidade de catalase é encontrada

no citosol. Assim, a GPx hepática e branquial parece ter sido induzida nos peixes expostos ao inseticida e isso possibilitou a retirada do provável excesso de H₂O₂, uma vez que a catalase teve sua atividade inibida.

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) está presente no citoplasma de todas as células. Esta é uma enzima importante da fase oxidativa da via das pentoses, pois produz NADPH para a célula (SALTMAN, 1989). O NADPH formado é essencial para o crescimento e proliferação celular, já que serve como fonte de hidrogênios e elétrons para uma grande variedade de reações de biossíntese (SENTURK et al., 2009).

No estudo de SENTURK e colaboradores (2009) demonstrou-se que dentre três pesticidas testados, a deltametrina foi a substância que mais inibiu a atividade da G6PDH nas menores doses. Isso mostra que peixes são suscetíveis à ação da deltametrina, pelo menos sob o ponto de vista desta enzima.

Contudo, em nosso estudo, os matrinxãs expostos a deltametrina apresentaram atividade aumentada de G6PDH hepática após 96 horas. Nas brânquias e no rim a atividade da G6PDH não variou entre os peixes expostos e os respectivos grupos Controle (não expostos).

O aumento de atividade da G6PDH neste contexto, possivelmente se justifica no fato de que ela produz NADPH necessário para a reação de redução da glutatona oxidada (via glutatona redutase); reação esta que produz glutatona reduzida, que por sua vez participa da reação catalisada pela glutatona peroxidase, bem como pode atuar diretamente como antioxidante na célula.

8.1.3 Antioxidantes não Enzimáticos

Glutatona reduzida (GSH) é o principal tiol não protéico e um dos principais antioxidantes encontrados nas células (SIEGERS, 1989). A GSH, como visto, doa elétrons durante a reação catalisada pela glutatona peroxidase e também possui propriedades antioxidantes, sendo capaz de remover diretamente ERO da célula. Ela também atua como substrato da GST durante a conjugação com xenobióticos (biotransformação fase II). Em vista disso, está bem estabelecido nos estudos de toxicologia que muitas vezes a GSH pode servir como biomarcador de estresse oxidativo induzido por poluentes ambientais (HASSPIELAR et al., 1994). SAYEED e colaboradores (2003) trabalhando com exemplares de *Channa punctatus* expostos a

deltametrina, observaram elevações nas concentrações de GSH no fígado, rim e brânquias, da ordem de 52%, 338% e 386% respectivamente.

Em nosso estudo os matrinxãs expostos a deltametrina também apresentaram um aumento no conteúdo hepático de glutatona reduzida depois de 96 horas e após a recuperação de 10 dias, quando comparados com peixes do grupo Controle. Este aumento de GSH no fígado, foi acompanhado pelo aumento de atividade da GST e GPx hepática.

O aumento observado no conteúdo de GSH hepático deve ser devido ao aumento no consumo de suas reservas, com a subsequente produção de mais glutatona reduzida na célula. Isto porque os aumentos de atividade da GST e da GPx observados, provavelmente incrementaram a demanda por este antioxidante não enzimático. Ainda, além de participar das reações catalisadas pela GST e GPx, a GSH parece também ter desempenhado a função de antioxidante, para lidar com as ERO possivelmente geradas em decorrência da exposição dos peixes a deltametrina.

O conteúdo de GSH nas brânquias e no rim dos peixes expostos diminuiu após 96 horas. A diminuição de GSH nas brânquias é coerente com o aumento de atividade da GPx neste órgão, indicando que esta enzima tenha, de fato, utilizado GSH para lidar com altas concentrações de H_2O_2 . Nas brânquias e no rim, as reservas de GSH possivelmente foram suficientes para a desintoxicação, não sendo necessário, portanto, a produção de mais GSH celular.

De acordo com SAYEED e colaboradores, (2003) quando as defesas antioxidantes enzimáticas não são suficientes, defesas secundárias, como o ácido ascórbico, atuam como antioxidantes e reagem com as ERO para prevenir danos causados por estas.

O ácido ascórbico é um poderoso antioxidante, podendo reagir rapidamente com radical superóxido, por exemplo. Os tecidos que apresentam as maiores concentrações de ácido ascórbico em peixes são o rim, o fígado, o cérebro e as brânquias (CARR et al., 1983).

Exemplares de *C. punctatus* expostos a deltametrina por 48 horas apresentaram incrementos no conteúdo hepático e renal de ácido ascórbico (SAYEED et al., 2003).

Em nosso estudo, por outro lado, os matrinxãs expostos a deltametrina apresentaram diminuição do conteúdo hepático e renal de ácido ascórbico após 96 horas, quando comparados com peixes não expostos.

De acordo com DATTA e KAVIRAJ (2006), diminuições no conteúdo de ácido ascórbico no fígado e no rim de peixes expostos a deltametrina, são indicativos da ocorrência de estresse oxidativo. Assim, os autores concluem que depleções no conteúdo deste antioxidante indicam provavelmente, um mecanismo de defesa contra o estresse induzido pelo inseticida.

Contudo, os dados disponíveis na literatura relacionada indicam que as respostas relacionadas ao conteúdo de ácido ascórbico nos diferentes tecidos, variam muito conforme a espécie e o inseticida em estudo. Tal fato influencia e limita a confiabilidade deste parâmetro como bioindicador de estresse oxidativo induzido por pesticidas (SAYEED et al., 2003).

8.1.4 Enzimas Transaminases e Fosfatases

Além dos elementos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, outras enzimas como, por exemplo: alanina aminotransferase (ALAT); aspartato aminotransferase (ASAT) e fosfatases alcalina (FALC) e ácida (FAC), quando presentes no plasma sanguíneo, podem agir como indicadores de estresse (VELISEK, 2006) e também como biomarcadores de lesões ao fígado, rim e brânquias (VENKATESWARA RAO, 2006). Um estudo de AWAD e colaboradores (1998) revelou que existe uma correlação estatística confiável entre lesões celulares e a presença destas enzimas específicas no sangue.

SAYEED e colaboradores, (2007) observaram que juvenis de tilápia do Nilo expostos a deltametrina, em condições laboratoriais, apresentaram aumentos no plasma de atividade enzimática da fosfatase alcalina, e das transaminases ALAT e ASAT.

Em nosso estudo os matrinxãs expostos a deltametrina apresentaram aumento de atividade da ASAT hepática após a recuperação de 10 dias. Também registramos aumentos de atividade da ALAT hepática após as recuperações de 10 e 20 dias. No plasma, os matrinxãs expostos a deltametrina apresentaram aumento de atividade da ASAT e ALAT após 96 horas, quando comparados com os peixes não expostos. A fosfatase alcalina também teve sua atividade aumentada no fígado dos matrinxãs

expostos a deltametrina, após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. No plasma também foram registrados aumentos de atividade da fosfatase alcalina nos matrinxãs expostos a deltametrina, após os períodos de recuperação de 10 e 20 dias. Tais resultados nos sugerem possíveis mudanças no metabolismo protéico dos peixes expostos a deltametrina, tais como a utilização de aminoácidos para obtenção de energia, ou o recrutamento destes para a gliconeogênese (EL-SAYEED et al, 2007).

As fosfatases alcalina e ácida são enzimas importantes em processos biológicos. As fosfatases são enzimas que participam do processo de desintoxicação, no metabolismo intermediário e na biossíntese de macromoléculas energéticas. Por conseguinte, interferências na atividade destas enzimas podem levar a alterações em processos bioquímicos celulares.

Em suma, aumentos de atividade das transaminases e fosfatases no fígado e no plasma nos sugerem possíveis mudanças no metabolismo protéico deste tecido, bem como caracterizam lesão tecidual do fígado, das brânquias e do rim, em estudos de toxicologia aquática (EL-SAYEED et al., 2007). Contudo, análises histopatológicas interpretadas em conjunto com dados de atividade enzimática das fosfatases e transaminases, são essenciais na verificação de ocorrência ou não de lesões teciduais.

8.1.5 Considerações finais

Apesar de existirem numerosos estudos sobre a indução das defesas antioxidantes por poluentes aquáticos (xenobióticos) em peixes, o conhecimento da dinâmica da relação entre o sistema de defesa antioxidante e as fontes de espécies reativas de oxigênio ainda é limitado (LIVINGSTONE, 2001). A partir disto, podemos dizer que os parâmetros avaliados, em nosso estudo com matrinxãs, serviram como indicadores de estresse oxidativo, porém com diferentes graus de especificidade.

Os dados obtidos em nosso estudo nos revelam que a exposição subletal ao inseticida Keshet[®], de fato, induziu alterações nos elementos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos dos matrinxãs. De acordo com VALAVANIDIS (2006), o estresse oxidativo é representado também por alterações nas enzimas antioxidantes. Considerando que algumas enzimas-chave do metabolismo antioxidante e de biotransformação, tais como: GST; SOD; CAT, GPx e G6PDH; e as moléculas antioxidantes GSH e ácido ascórbico, sofreram alterações nos peixes expostos ao inseticida, sugerimos que sob o

ponto de vista dos parâmetros avaliados, houve indução de estresse oxidativo. Ainda, devido à alta taxa de absorção deste xenobiótico, possivelmente pelas brânquias, concentrações mínimas em água, como a concentração testada de 0,26 µg/L, podem ser suficientemente danosa aos peixes.

No entanto, uma compreensão mais ampla sobre a indução de estresse oxidativo, poderia ser obtida a partir de outras análises, tais como, quantificação de produtos da peroxidação lipídica (ensaio T-BARS); detecção de proteínas carboniladas e quantificação de metalotioneínas.

As evidências apresentadas neste estudo, somadas aos dados disponíveis na literatura relacionada, revelam a alta toxicidade do piretróide deltametrina para peixes. Assim, sugerimos que sejam previamente avaliados os riscos ambientais inerentes ao emprego indiscriminado de inseticidas piretróides na agricultura; no uso veterinário e doméstico; e principalmente, no controle de vetores transmissores de doenças e no controle químico de parasitas de peixes, visto que nestas duas últimas situações, a deltametrina é aplicada diretamente na água.

9. CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho são:

1) O valor de toxicidade aguda ($CL_{(1)50;96h}$) da deltametrina (Keshet[®]) para matrinxãs, encontrado em nosso trabalho foi de 2,6 $\mu\text{g/L}$.

2) Os matrinxãs expostos a 0,26 $\mu\text{g/L}$ de deltametrina (Keshet[®]) sofreram alterações nos elementos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, quando comparados com o grupo Controle.

3) Os matrinxãs expostos a 0,26 $\mu\text{g/L}$ de deltametrina (Keshet[®]) sofreram alterações na atividade enzimática das transaminases e fosfatase alcalina, quando comparados com o grupo Controle.

4) Após o período de recuperação proposto, não houve diferenças de atividade enzimática dos elementos antioxidantes, bem como do conteúdo tecidual das substâncias antioxidantes não enzimáticas, entre os matrinxãs expostos a 0,26 $\mu\text{g/L}$ de deltametrina (Keshet[®]) e seus respectivos grupos Controle.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI**. A revista da clínica médica, v.26, p. 141-164, 1993.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes. Norma ABNT-NBR 15088. p.19, 2006b.
- AHMAD, S. Preface. In: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. **Chapman & Hall**, NY, p. 11-17, 1995.
- AHAMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H. S., JAIN, S. K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1519, pp. 37-48, 2000.
- AHARONSON, N.; COHEN, S. Z.; DRESCHER, N.; GISH, T. J.; GORBACH, S.; KERANEY, P. C.; OTTO, S.; ROBERTS, T. R.; VONK, J. W.; **Pure Appl. Chem.**, p.59, 1419, 1987.
- 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.
- ANÀDON, A. et al. Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. **Toxicol. Lett.**, v.165, n.1, p.47-56, 2006.
- ANSARI, M.A., RAZDAN, R.K. Concurrent control of mosquitoes and domestic pests by use of deltamethrin-treated curtains in the New Delhi Municipal Committee, India **J. Am. Mosquito Control Assoc.**, v. 17, p. 131-136, 2001.
- 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** http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_agrotoxico.asp?iVarAux=1&MarcaCod=306. Acesso em dezembro de 2008.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/noticias/2008/091208_link.htm. Acesso em dezembro de 2008.

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

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 17ed. Washington, D.C. 1991, p. 81-143.

ASPELIN, A., L., Pesticides Industry Sales and Usage: 1994-95 Market Estimates. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1997.

AVILEZ, I., 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.

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

BARCELO, D.; **J. Chromatogr.**, 643, 117, 1993.

BARCELO, D.; HENNION, M. C.; Trace determination of pesticides and their degradation products in water. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry** v.19, Elsevier Science B. V.; Amsterdam, 1997.

BARLOW, S., M., SULLIVAN, F., M., LINES, J. Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. *Food Chemical Toxicology*, v.39, p.409-422, 2001.

BERGMEYER, H.U., BEACH, W.D. **Methods of enzymatic analysis**. Weinheim Durfield Beach, Florida Basel. 3.ed. 1983.

BERGMEYER, H.U.; SCHELBE, P. Optimization of methods for Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase. **CLIN. CHEM**, v. 24/1, 58-73, 1978.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: manual of biochemical methods**. 3. ed., Grune & Stratton, INC, 187p, 1984.

BIANCHI, M.L.P., ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p.123-130, 1999.

BLOOMQUIST, J. R. **Insecticides: chemistries and characteristics**. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>. Acesso: em 05 fev 2007.

BONACELLA, P.H. A poluição das águas. **Coleção Desafio**. Moderna SP, p.28-30, 1990.

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

CANADA, A., T., CALABRESE, E., J. Superoxide dismutase: its role in xenobiotic detoxification. **Pharmacol. Therapeut.** v. 44, pag.285–295, 1989.

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

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

CASIDA, J.E., GAMMON, D.W., GLICKMAN, A.H., LAWRENCE, L.J. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 23, p. 413–438, 1983.

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.

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.

DATTA, T.K., KAVIRAJ, A. Acute toxicity of cadmium to fish *Labeo rohita* and copepod *Diaptomus forbesi* preexposed to CaO and KMnO₄. **Chemosphere** 42, 955-958, 2001.

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, K.J.A. Oxidative stress, the paradox of aerobic life. In: C. Rice-Evans, B. Halliwell and G.G. Land, Editors, **Free Radical and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives**, London, Portland Press, pp. 1–31, 1995.

DAVIES, K., J., A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochem. Soc. Symp.** V. 61, pág.1–31, 2000.

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.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cellfunction. **Physiol Rev** V.82:pag. 47–95.

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 SAYED, Y.S., SAAD, T.T., EL BAHR, S.M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile Tilapia, with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environ. Toxicol. And Pharmacology**. p. 981-987, 2007.

EL-SAYED, Y., S., SAAD., T., T. Subacute Intoxication of a Deltamethrin-Based Preparation (Butox® 5% EC) in Monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 102, pag.293–299, 2007.

EPA-US. AGÊNCIA NACIONAL PARA PROTEÇÃO DO MEIO AMBIENTE AMERICANA. **Current National Recommended Water Quality Criteria**. Disponível em < <http://www.epa.gov/>> Acesso em 2008.

FENECH, M., FERGUSON, L.R. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Editorial, Mutat. Res.** 475, pp. 1–6, 2001.

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.

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

GEORGE, S. G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: MALINS, D.C., OSTRANDER, G.K., (Eds), **Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives**. Lewis Publisher, CRC Press, p.37-85, 1994.

GILMAN, A. G. Farmacocinética ; a dinâmica da absorção , distribuição e eliminação dos fármacos In: **GOODMAN & GILMAN: as bases farmacológicas da terapêutica** 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamerica editora, seção 1, cap.1 p. 3-21, 1996.

GLICKMAN, A. H.; CASIDA, J. E. Species and structural variations affecting pyrethroid neurotoxicity. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, Tarrytown, v. 4, p.793-799, 1982.

GOEPTAR, A. R., SCHEERENS, H., VERMEULEN, N.P. Oxygen and xenobiótico reductase activities of cytochrome P450. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 25, n. 1, p. 25-65, 1995.

GOLDSTEIN, E. G., CLYMO, R. S. **Methods for chemical analysis of freshwater**. IBP Handbook n.8. Blackwell Scientific publications, Oxford., 1969, 171p.

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.

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.

HABIG, W., PABST, M. J., JACOBY, W. B. Glutathione-S-transferases: The first step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** n. 249, pp. 7130-7139, 1974.

HALLIWEL, B., GUTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine (third ed), **Oxford University Press**, Oxford, 1999.

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

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

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

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton, Florida: CRC. Press. 1995, 245 p.

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.**, New York, v. 62, p. 71-79, 2001.

HIGASHI, K. Relatório do XV Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas, (São Paulo) p.68 1991.

HODGSON, E. **Textbook of modern toxicology**. 3rd ed. USA: John Wiley & Sons Publication.. 557 p, 2004.

HOLLOWAY, S. F.; SALGADO, V. L.; WU, C. H.; NARAHASHI, T. Kinetic properties of single sodium channels modified by fenvalerate in mouse neuroblastoma cells. **Pflugers Arch.**, Berlin, v. 414, p. 613-621, 1989.

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

INSTITUTO MUNDIAL DE PESQUISAS (WRI). Pesticides and the Immune System: The Public Health Risks. III-Pesticide Exposure p. 9-16. Repetto, R. & Baliga S. S. eds. 104 pag. ISBN 1-56973-087-3, 1996.

INSTITUTO MUNDIAL DE PESQUISAS (WRI). **World Resources**, 1998/1999. Oxford University Press, UK.

IWANA, G., NAKANISHI, T. The fish immune system, organism, pathogen and environment. **Academic Press** v.15, San Diego, California 1996.

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.

KAMLAVENI, K., GOPAL, V., SAMP SON, U., ARUNA, D. Effect of pyrethroids on carbohydrate metabolic pathways in common carp *Cyprinus carpio*. **Pest Management Science**, v. 57, p. 1151-1154, 2001.

KELLY, S.A., HAVRILLA, C.M., BRADY, T. C., ABRAMO, K. H., LEVIN, E. D. Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. *Environmental Health Perspectives*, v.106, N.7, p. 375-384, 1998.

KIRKMAN, H.N.; GAETANI, G.F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NNADPH. **PNAS**, v. 81, p. 4343-4347, 1984.

KONO, Y., FRIDOVICH, I. Inhibition and reactivation of Mn catalase: implications for valence changes at the active site manganese. **J Biol Chem** 258: pag. 13646-13648, 1983.

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.

KOTKAT, H.M., RADY, A.A., JANOS, N. Sublethal effects of phenol on the phospholipids fatty acid composition of carp erythrocyte plasma membrane. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.42, p.35-39, 1999.

KUMAR, S, LATA, S, GOPAL K. Deltamethrin induced physiological changes in freshwater cat fish *Heteropneustes fossilis*. **Bull Environ Contam Toxicol**;62:254–8, 1999.

LAKOTA, S., RASZKA, A., T., U, Z. CHMIEL. Side-effect of deltamethrin and cypermethrin in the environment of water biocenoses, **Organika** v.71 pag.71–77, 1989.

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

LECH, J.J., VODCNIK, M.J. Biotransformation. In: RAND, G.M., PETROCELLI, S.R. (Eds), **Fundamentals of aquatic toxicology; Methodos and Applications**. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, p.526-557, 1985.

LIMA, F.L. Brycon. In: Buckup, P.A & Menezes, N.A. (eds.) **Catálogo dos Peixes Marinhos e de Água Doce do Brasil**. 2ª ed., 2003. URL: <http://www.mnrj.ufrj.br>. Acesso em outubro de 2007.

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

McINTYRE, M.; BOHR, D.F.; DOMINIZAK, A.F. Endothelial function in hypertension, the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, p. 539-545, 1999.

MASHINO, T., FRIDOVICH, I. Superoxide radical initiates the autoxidation of dihydroxyacetone. **Arch Biochem Biophys** 254:547-554 1987.

MARTINS, E.A.L., CHUBATSU, L.S., MENEGHINI, R. Role of antioxidants in protecting cellular DNA from damage by oxidative stress. **Mutat. Res.** v. 250, pp. 95–101, 1991.

MARTINSEN, B, ALEXANDERSEN, S, FOSSUM, BH: Deltamethrin, an effective treatment against the isopod sea lice *Ceratothoa oestroides* infecting farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Disease of fish and shellfish, Tenth International Conference, Trinity College, Dublin, Ireland, O-096, 2001.

McCORD, J. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, 108, 8, pp. 652-659. 2000.

- MANNA, S. et al. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. **J. Vet. Sci.**, v.7, n.2, p.133-136, 2004.
- 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.
- MESTRES, R., MESTRES, M. Deltamethrin: uses and environmental safety, **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** V.124 pag.1–18, 1992.
- 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.
- NORDBERG J., ARNER E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**31: pag. 1287–1312, 2001.
- NOHL, H., HEGNER, D. Identification of free hydroxyl radicals in respiring heart mitochondria by spin trapping with nitron DMPO. **FEBS Lett** 123:241-244, 1981.
- ODAJIMA, T., YAMAZAKI, I. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. III. The reaction of ferric myeloperoxidase with superoxide anion. **Biochim Biophys Acta** 284: pag. 355-359, 1972.
- OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C. O. C.; MOREIRA, J. C. Influência de fatores sócioeconômicos na contaminação por agrotóxicos. **Rev. Brasileira de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, nº 2, p. 130-135, 2001.
- OMS – Organização Mundial da Saúde/Programa ambiental das Nações Unidas. **Public health impact of pesticides used in agriculture**. Geneva: WHO/UNEP; 1990.
- OMS - Organização Mundial da Saúde. **Deltamethrin. Environmental Health Criteria 97**, Geneva, p. 3, 1990.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. **Guías para la calidad del agua potable**. v.1 Recomendaciones. 2ª ed., Genebra, 1995.
- PARVEZ, S., RAISUDDIN, S. Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to deltamethrin. **Chemosphere**, v. 62, 1324-1332, 2006.

- PEDRAJAS, J.R., PEINADO, J., LÓPEZ-BAREA, J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms Cu, Zn-superoxide dismutase as potencial biomarkers. **Chemico-Biological Interactions** n. 98, pp. 267-282, 1995.
- PIMPAO C., T., ZAMPRONIO A., R., SILVA de ASSIS H., C. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pestic Biochem Physiol**; **88**: pag.122–7, 2007.
- PRADHAM, D., WEISER, M., LUMLEY-SAPANSKY, K., FRAIZIER, D., KEMPER, S., WILLIAMSON, P., SCHLEGEL, R.A. Peroxidation-induced perturbation of erythrocyte lipid organization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 123, p. 3404, 1990.
- PORTER, T.D.; COON, M.J. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 21, p. 13469-13472, 1991.
- PUNCHARD, N.A., KELLY, F. J. Free Radicals: A Practical Approach. **Oxford:IRL Press**, 1996.
- RAO, J.V. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. **Chemosphere**, v. 65, p.1814-1820, 2006.
- RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. Taylor and Francis Publishing, Washington, DC, p.1150, 1995.
- RAO, K.J, C. MADHU, MURTHY, V.S.R. Histopathology of malathion on gills of a freshwater teleost, *Tilapia mossambica* (Peters), **J. Environ. Biol.** 4 pag.9–13, 1983.
- ROCHE, H., BOGÉ, G. Fish blood parameters as potencial tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. **Mar. Environ. Res.**, v. 41, n. 1, pp. 27-43, 1996.
- RODRIGUES, L., C. Estudo das Glutathionas-S-Transferases hepáticas solúveis do peixe *P. mesopotamicus* Holmeberg 1887 (pacu). Tese de Doutorado, Pós-graduação em Biologia do Instituto de Biologia Roberto de Alcântara Gomes, UERJ, Rio de Janeiro, RJ, 2003.
- SALTMAN, P. Oxidative stress: a radical view. **Seminars in hematology**, v. 26, n. 4, p. 249-256, 1989.

SALVI, A., CARRUPT, P.A., TILLEMENT, J.P., TESTA, B. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants and influence of protein binding. *Biochem. Pharmacol.*, v. 61, p.1237-1242, 2000.

SANTOS, R.V.A racionalidade dos agrotóxicos e seus efeitos deletérios a saúde. **Caderno Informativo de Prevenção de Acidentes**, São Paulo, n.200, p.59-65, 1996.

SARAVANA BHAVAN, P., GERALDINE, P. Hstopatology of the hepatopancreas and gills of the prawn *M. malcomsonni* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology* v.50, p.331-339, 2000.

SAYEED, I., PARVEZ, S., PANDEY, S., BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R., RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotox. And Environ. Saf.** 56, 295-301, 2003.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress; molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHAFFERT, R.R., KINGSLEY, GR. Ascorbic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 212, pp. 59-61, 1955.

SEVATDAL, S, HORSBERG, T.,E.: Monitoring of sensitivity/resistance of norwegian salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis* K.) strains to pyrethroids (deltamethrin and cypermethrin) with bioassay. In : Disease of fish and shellfish, Tenth International Conference, Trinity College, Dublin, Ireland, P-161, 2001.

SEVATDAL, S., HORSBERG, T.E.,. Determination of reduced sensitivity in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) against tthe pyrethroid deltamethrin using bioassays and probit modelling. **Aquaculture** 218, 21– 31, 2003.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.10, n.4, p.308-313, 2004.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Ang. Chem.-Int.** Ed. 25, 1058–1071, 1986.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 31-38, 1991.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, n. 6, p. 812-816, 2004.

SMITH, T.M., STRATTON, G.W. Effects of synthetic pyrethroid insecticides on nontarget organisms. **Res. Rev.**, v. 97, 93–119, 1986.

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

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, J. T.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, Shannon, v. 171, p. 3-59, 2002.

SOLOMON, K.R., GIDDINGS, J.M., MAUND, S.J. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: I. Distributional analysis of laboratory aquatic toxicity data. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 20, p. 652–659, 2001.

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.

SRIVASTAVA, S.K., JAISWAL, R., SRIVASTAVA, A.K. Lethal toxicity of deltamethrin (Decis) to a freshwater fish *Heteropneustes fossilis*. **J. Adv.Zool.**, v. 18, p. 23–26, 1997.

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.

SVOBODOVA, S., LUSKOVA, J. M.J., LABEK, V. Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.), **Acta Vet. Brno.** 72 79–85, 2003.

STADTMAN, E.R., BERLETT, B.S.. Reactive oxygen mediated protein oxidation in aging and disease. **Chem. Res. Toxicol.** v.10, pag.485–494, 1997.

STEGEMAN, J.J., BROUWER, R., DIGIULIO, R.J., FORLIN, L., FOWLER, B.M., SANDERS, B.M., VAN VELD, P. Molecular responder to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect.

Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological markers of antropogeni stress. Eds. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 235, 1992.

TABAREAN, I. V.; NARAHASHI, T. Potent modulation of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels by the type II pyrethroid deltamethrin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 284, p. 958-965, 1998.

TAVARES, L., H., S. **Limnologia aplicada à aqüicultura.** Jaboticabal, SP: FUNEP, 1994.

THOMSON, W.T. Insecticides. **Agricultural Chemicals Book.** I. Thomson Publications, Fresno, p. 2–16, 1985.

TSUDA, T., AOKI, S., INOUE, T., KOJIMA, M. Accumulation and excretion of diazinon, fenitrothion and fenitrothion by killifish: comparison of individual and mixed pesticides. **Water Research** v 29 (2); p 455-458, 1995.

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.

VAL, A. L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia.** Manaus, AM: INPA, 160 p, 1995.

VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

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.

VELISEK, J., JURČÍKOVÁ, J., DOBSÍKOVÁ, R., SVOBODOVÁ, Z., PIACKOVÁ, V., MÁCHOVÁ, J., NOVOTNÝ, L. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 297–301, 2006.

VENKATESWARA R., J. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. **Chemosphere** 65, pag.1814–1820, 2006.

- VERMEULEN, N.P.E. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides, C. (Ed.), Cytochromes P450: Metabolical and toxicological aspects. **CRC Press**, Boca Raton, FL, USA, p.29-53, 1996.
- VERSCOYLE, R. D.; ALDRIDGE, W. N. Structureactivityrelationships of some pyrethroids in rats. **Arch. Toxicol.**, v.45, p.325-329, 1980.
- VILLARINI, M., MORETTI, M., PASQUINI, R., SCASSELLATI-SFORZOLINI, G., FATIGONI, C., MARCARELLI, M., MONARCA, S., RODRIGUEZ, A.V. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes. **Toxicology** 130, 129-139, 1998.
- VIJVERBERG, H. P. M.; VAN DER ZALM, J. M.; VAN DEN BERCKEN, J. Similar mode of action of pyrethroids and DTT on sodium channel gating in myelinated nerves. **Nature**, London, v. 295, p. 601-603, 1982.
- VIJVERBERG, H. P. M.; van den BERCKEN, J. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 21, p. 105-126, 1990.
- VIRAN, R., ERKOC, F.U., POLAT, H., KOCAK, Ö. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 55, p.82-85, 2003.
- WAUCHOPE, R. D.; BUTTLER, T. M.; HORNSBY, A. G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P. W. M.; BURT, J. P.; **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** p.123, 1992.
- WILSON, C., TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics** v.39 p.449-462, 2001.
- WILHELM-FILHO, D. Effects of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, p. 349-357, 2005.
- WINSTON, G.W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100, p. 173-176, 1991.
- YOUNG, I.S., WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease, **J. Clin. Pathol.** V. 54, p. 176-186, 2001.

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

ZANIBONI FILHO, E. et al. Caracterização morfológica do matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (TELEOSTEI: CHARACIDAE). *Rev. Brasil. Biol.*, v. 48, n. 1, p. 41-50, 1988.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEING, M.A. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, v. 19, p. 233-240, 2006.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD 2), and EC – SOD (SOD 3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.